ZELLPROLIFERATION UND CANCEROGENESE: UNTERSUCHUNGEN AN DER RATTENLEBER NACH ZWEIMALIGER HEPATEKTOMIE UND ZELLSYNCHRONISATION DURCH HYDROXYHARNSTOFF

Antonio A. Hartmann

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547028_0068

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. M. Eder

ZELLPROLIFERATION UND CANCEROGENESE:

UNTERSUCHUNGEN AN DER RATTENLEBER NACH ZWEIMALIGER HEPATEKTOMIE UND ZELLSYNCHRONISATION DURCH HYDROXYHARNSTOFF

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Antonio A. Hartmann

aus Montenegro/Brasilien

München 1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hartmut Rabes

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Max Eder

Dekan: Prof. Dr. med. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen
Austauschdienstes

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Professor Rabes für die Themenstellung und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Bei Herrn Professor Eder möchte ich mich für die Gastfreundschaft und die Möglichkeit zu experimenteller Arbeit an seinem Institut bedanken.

Ich bedanke mich bei Frau Wendt, Frau Sickert und Frau Rode für die technische Assistenz bei der Durchführung der Experimente und Herstellung der histologischen Präparate. Mein besonderer Dank gilt Frau Wendt für die Hilfe bei der Anfertigung des Manuskriptes.

Herrn Hampe und Frau Döhle danke ich für die fototechnische Bearbeitung.

Ein Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes ermöglichte mir den Aufenthalt in der Bundesrepublik Deutschland.

Die experimentellen Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell unterstützt.

INHALTSVERZEICHNIS

A. Einleitung 1

B. Experimenteller Teil 8

1. Proliferationskinetische Untersuchungen .. 8

1.1. Material und Methode 8

1.1.1. Versuchstiere 8

1.1.2. Bildung der Versuchsgruppen 8

1.1.3. Partielle Hepatektomie 11

1.1.4. Gewichtsbestimmung des resezierten Lobus dexter lateralis 13

1.1.5. Hydroxyharnstoff-Infusionen 15

1.1.6. ^{3}H-TdR-Pulsmarkierung 16

1.1.7. Herstellung der histologischen Präparate und Autoradiographie 16

1.1.8. Auswertung der Autoradiogramme 17

1.2. Ergebnisse 18

1.3. Besprechung der Ergebnisse 26

2. Untersuchungen zur Cancerogenese 29

2.1. Versuchsansatz 29

2.2. Material und Methodik 29

2.2.1. Verwendetes Carcinogen und seine Applikation 29

2.2.2. Enzymhistochemische Reaktionen 32

2.2.3. Beschreibung des halbautomatischen Planimetriegerätes 34

2.2.4. Auswertung der enzymhistochemischen Präparate 34

2.3. Ergebnisse und Besprechung 36

2.3.1. Untersuchungen der ATPase-Defekte 90 Tage nach Carcinogengabe 36

2.3.2. Histochemische und morphometrische Untersuchungen sechs Monate nach Carcinogenexposition 39

2.3.2.1. Enzymhistochemische Präparate 39
2.3.2.2. Untersuchungen an ATPase-, Glukose-6-Phosphatase- und γ-Glutamyl-Transpeptidase-Serienschnitten im Maskenvergleichsmikroskop 46
2.3.2.3. ATPase-Präparate und Autoradiographie im Maskenvergleichsmikroskop 49
2.3.2.4. Morphologie der praeneoplastischen Bezirke 52

C. Zusammenfassende Diskussion 54

D. Zusammenfassung 61

E. Literaturverzeichnis 66

Abkürzungen

DÄNA	= Diäthylnitrosamin
^{3}H-TdR	= Tritium-markiertes Thymidin
HU	= Hydroxyharnstoff
CA	= Carcinogen
PH	= Partielle Hepatektomie
ATPase	= Adenosin-Triphosphatase
HE	= Hämatoxylin-Eosin
S	= DNS-Synthesephase des Zellzyklus
G_0	= Phase proliferativer Ruhe
G_1	= Präsynthetische Phase
G_2	= Postsynthetische, prämitotische Phase
M	= Mitosephase
MI	= Markierungsindex

A. EINLEITUNG

Das biologische Verhalten klinisch manifester menschlicher Tumoren folgt bestimmten Gesetzmäßigkeiten, die für jeden Tumortyp innerhalb gewisser Schwankungen spezifisch sind.

Der klinische Verlauf einer Tumorerkrankung erfolgt in Phasen, deren Sequenz für zahlreiche Geschwulsttypen bekannt und genau analysiert ist. Unter den Phasen des Tumorwachstums ist der Zeitraum zwischen der Initiation und klinischen Manifestierung des malignen Tumors, die praeneoplastische Latenzperiode, am wenigsten geklärt. Dieses Intervall nimmt beim Menschen in der Regel sehr lange Zeit in Anspruch, und die wichtigsten Abschnitte sind dabei nur unter großen experimentellen oder auch diagnostischen Schwierigkeiten anzugehen. Es ist unmöglich, beim Menschen die Entstehung eines Tumors von den Anfangsstadien bis hin zur klinischen Manifestierung zu verfolgen.

Die Phänomene der Initiationsphase spielen sich auf der molekularen Ebene ab und sind deshalb nur mit empfindlichen Analysenmethoden in Tierexperimenten, beim Menschen aber auch mit diesen nur unter wenigen speziellen Voraussetzungen überhaupt erfaßbar.

Besonders wichtig für die Initiation der chemischen Carcinogenese sind die molekularen Wirkungsmechanismen der zahlreichen chemischen Substanzen mit carcinogener Wirkung (Druckrey et al., 1967; Magee et al., 1975). In der chemischen Carcinogenese ist die Interaktion alkylierender Substanzen mit Makromolekülen der Zelle (DNS und RNS) bekannt (Magee und Farber, 1962; Loveless, 1969; Magee et al., 1975). Ein Beispiel ist die Alkylierung der O^6-Position am Guanin in der DNS von Lebern Dialkyl-Nitrosamin-behandelter Tiere (Goth und

Rajewsky, 1974; Nicoll et al., 1975; Rabes et al., 1979).

Eine schon von Virchow (1858) postulierte, wichtige Voraussetzung für die maligne Transformation scheint zu sein, daß nach Interaktion der carcinogenen Substanz mit der Zelle eine Zellproliferation erfolgt, die möglicherweise zur Fixierung einer promutagenen Läsion am Genom in eine Mutation führt (Rabes, 1979). Welche Phase der konsekutiv nach Carcinogeneinwirkung ablaufenden Proliferation dabei entscheidend ist, ist noch ungeklärt.

Die Analyse der Korrelationen zwischen Initiation der Carcinogenese und Position der Zielzelle im Zellzyklus ist schwierig. Nach verschiedenen Hypothesen scheint die entscheidende Phase im Prozeß der Initiation durch chemische Carcinogene die DNS-Synthese-Phase zu sein (Craddock und Frei, 1974; Fridman-Manduzio et el.,1977).

Um eindeutig zu belegende Aussagen zu erarbeiten, sind neue Versuchsmodelle erforderlich, die eine bessere Analyse der Phänomene ermöglichen, die die maligne Entartung begleiten.
Als Versuchsmodell für die genaue Analyse der Zusammenhänge zwischen Zellproliferation und Carcinogenese ist die Rattenleber gut geeignet. Dieses Modell wurde bereits vielfach verwendet.

In zellkinetischen Studien wurde festgestellt, daß sich Hepatozyten nach einer partiellen Hepatektomie etwa 14 Stunden lang in einer präparativen Phase befinden, in der die vorbereitenden Synthesen für eine DNS-Replikation ablaufen. Zwischen 15 und 18 Stunden nach der Operation tritt ein Teil der Hepatozyten in die DNS-Synthese-Phase ein (Oehlert et al., 1962; Rabes et al., 1976; Stöcker, 1966; Rabes, 1976) (Abbildung 1).

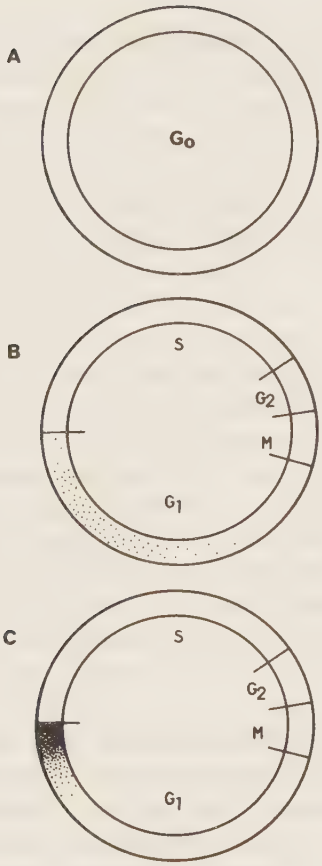


Abb. 1: Schematische Darstellung des Zellzyklus in der Leber in Ruhe (A) und in verschiedenen Stadien nach partieller Hepatektomie; B: physiologisch teilsynchronisierte Zellpopulation nach partieller Hepatektomie; C: Hydroxyharnstoff-synchronisierte Zellpopulation nach partieller Hepatektomie, in der die Leberzellen am Übergang von G_1 in die S-Phase blockiert werden.

(G_o = Phase proliferativer Ruhe, G_1 = Präsynthetische Ruhephase, S = DNS-Synthesephase, G_2 = Prämitotische Ruhephase, M = Mitosephase).

Die Regenration der Restleber nach Zweidrittel-Hepatektomie bis zur Wiederherstellung des ursprünglichen Lebergewichts dauert zwischen 2 bis 3 Wochen (Higgins und Anderson, 1931; Leduc, 1964). Der regeneratorische Zellersatz ist als ein kompensatorischer, hyperplastischer Vorgang zu betrachten, der mit einer temporären, zellulären Hypertrophie assoziiert ist (Leduc, 1964; Altmann, 1966; Bucher, 1967).

Ein höherer Synchronisationsgrad im Ablauf der physiologischerweise partiell synchronisierten Zellzyklusabläufe ist durch Verwendung von Cytostatica gelungen, insbesondere durch Hydroxyharnstoff (Rabes et al., 1977).
Nach 26-stündiger HU-Dauerinfusion im Anschluß an eine partielle Hepatektomie stellte man eine gleichzeitige DNS-Synthese bei mehr als 80% aller Hepatozyten fest. Eine HU-Infusion, die der Dauer des Zellzyklus entspricht, ergibt nach Absetzen des Blocks in vivo nicht das ideale Ergebnis einer 100%igen Synchronisation der DNS-Synthese und führt zu Schädigungen der Leberzellen (Iseler, 1977).
Eine fortgesetzte Blockade führt zum Zelluntergang (Sinclair, 1967). Bei der Rattenleber erfolgt durch HU-Gabe eine Hemmung der DNS-Synthese, jedoch keine Blockade der RNS- und Protein-Synthese (Schwartz et al., 1965; Yarbro et al., 1965). Diese Dissoziation der DNS- und RNS-Syntheseen wurde an Escherichia coli beobachtet und als "unbalanced growth" bezeichnet (Cohen und Barner, 1954). Auch an der Rattenleber wurde ein ähnlicher Vorgang beobachtet. Es kommt bei protrahierter HU-Blockade der DNS-Synthese zu einer zellulären Hypertrophie der Hepatozyten (Schmidkonz, Hübner, Rabes, 1977).

Die Hemmung der DNS-Synthese durch Hydroxyharnstoff (Abbildung 1) ist reversibel; der Angriffspunkt ist vermutlich die Inhibition der Ribonucleosid-Diphosphat-Reductase (Young und Hodas, 1964; Schwartz et al., 1965; Ramsier et al., 1977).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine HU-Infusionszeit von zehn Stunden gewählt, um eine Zellschädigung möglichst zu verhindern, ohne aber auf eine hohe Synchronisation verzichten zu müssen.

Im zellkinetischen Teil dieser Arbeit stand die Frage des biologischen Verhaltens der Leber nach zweimaliger Teilhepatektomie mit anschließenden Hydroxyharnstoff-Infusionen im Vordergrund.
Um einen vollständigen regeneratorischen Prozeß zu sichern, wurde ein Zeitraum von drei Wochen zwischen einer klassischen Zweidrittel-Hepataktomie (Higgins und Anderson, 1931) und einer zweiten Operation gewählt, in der der Lobus dexter lateralis (Abbildungen 3 und 4) reseziert wurde.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollen die zellkinetischen Grundlagen für weitere Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Zellproliferation und Carcinogenese erarbeitet werden.
In diesen weiteren Untersuchungen wurde die Leber mit Hilfe dreier verschiedener Methoden untersucht:

1. Enzymhistochemie,
2. Autoradiographie,
3. Morphologische Untersuchungen an paraffineingebettetem Gewebe.

Die quantitativen Auswertungen in der Enzymhistochemie wurden mit Hilfe der ATPase-Reaktion gemacht. Zwei

weitere enzymhistochemische Reaktionen (Glukose-6-Phosphatase und γ-Glutamyl-Transpeptidase) wurden mit der ATPase verglichen.

Diese Kombination verschiedener Methoden zur Erfassung praeneoplastischer Leberveränderungen beruht auf folgenden Beobachtungen: In Carcinogen-behandelten Ratten wurden von Gössner und Friedrich-Freksa (1964) in der Leber Glukose-6-Phosphatase-freie Zellinseln vor dem Auftreten von Carcinomen beobachtet. Später wurden Veränderungen bei zusätzlichen enzymhistochemischen Reaktionen während der praeneoplastischen Phase festgestellt (Scherer et al., 1972; Pitot et al., 1978). Zellkinetische Untersuchungen ergaben,daß ATPase-freie Bezirke aus Subpopulationen mit erhöhter Wachstumsrate bestehen (Rabes et al.,1972).

Hyperplastische Knoten sind auch in Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Präparaten zu sehen. Auf basophile, hyperplastische Knoten als Vorstufe von Tumoren wurde hingewiesen (Sasaki und Yoshida, 1935). Die basophilen, zellreichen Knoten wurden von Grundmann und Sieburg (1962), Oehlert und Hartje (1963) und anderen Autoren "Microcarcinome" gennant. Farber (1976) beschrieb die Eigenschaften der praeneoplastischen Knoten und klassifizierte sie in

a) hyperplastische oder enzymdefiziente Areale, Inseln oder Herde,
b) frühe hyperplastische Knoten,
c) späte hyperplastische Knoten und
d) hyperbasophile Herde.

Die verschiedenen Zellsorten, die in diesen Bezirken in Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Präparaten zu sehen sind, wurden von Bannasch (1976) in "klarzellige","acidophile", "vacuolisierte" und "basophile" sowie "intermediäre" Zellen eingeteilt. Die Bezeichnung bezieht sich

auf die Intensität des von der Zelle aufgenommenen Farbstoffes (Hämatoxylin-Eosin).

Diese vielfältigen geschilderten, morphologischen, enzymhistochemischen und autoradiographischen Veränderungen in Subpopulationen der Leber treten auch bei Behandlung von Ratten mit Diaethylnitrosamin auf. Diaethylnitrosamin ist ein alkylierendes Agens, wird metabolisch aktiviert (Magee et al., 1975) und verursacht geringe toxische Schädigungen, wenn es in geringen Dosen verabreicht wird. Die DL_{50} beträgt 280 mg/kg (Druckrey et al., 1967).

Nach einer einmaligen Diaethylnitrosamin-Gabe bleibt die Anzahl der Enzymdefekte von der sechsten Woche an für mehrere Wochen konstant. Ab einer Dosis von 30 mg/kg bleibt die Proliferation der Bezirke gegenüber dem Restparenchym unverändert erhöht (Scherer und Emmelot, 1976). Daher wurde in den vorliegenden Versuchen eine erste Serie von Tieren 90 Tage und eine zweite sechs Monate nach der Behandlung untersucht.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Proliferationskinetische Untersuchungen

1.1. Material und Methode

1.1.1. Versuchstiere

Für alle Versuche wurden männliche Wistar-Ratten (Wistar AF/Hann) eigener Zucht mit einem Gewicht zwischen 220 - 230 g verwendet. Sie erhielten Altromin-R-Standard-Diät (Altromin-R, Lage) und Wasser ad libitum. Sie wurden in Makrolonkäfigen bei normalem Tag-Nacht-Rhythmus im klimatisierten Tierstall gehalten.

1.1.2. Bildung der Versuchsgruppen

Für die erste Serie von Untersuchungen wurden zwei Behandlungsgruppen "A" und "B", wie in der Abbildung 2 dargestellt, gebildet. Weiterhin wurde eine Kontrollgruppe zusammengestellt, um die Überlebenszeit zu überprüfen (Abbildung 2).
Die Tiere der Gruppe "A" erhielten 14 Stunden nach Zweidrittel-Hepatektomie eine 10-stündige Hydroxyharnstoff-Infusion. Drei Wochen nach dieser Behandlung wurden die Tiere ein zweites Mal hepatektomiert, wobei der Lobus dexter lateralis entnommen wurde.Danach bekamen die Tiere erneut eine zehnstündige HU-Infusion.
Von der 1. bis 8. Stunde nach Absetzen der HU-Infusionen wurden in einstündigem Abstand jeweils drei Tiere pro Zeitpunkt mit Tritium-markiertem Thymidin (^{3}H-TdR) injiziert und eine Stunde später getötet.

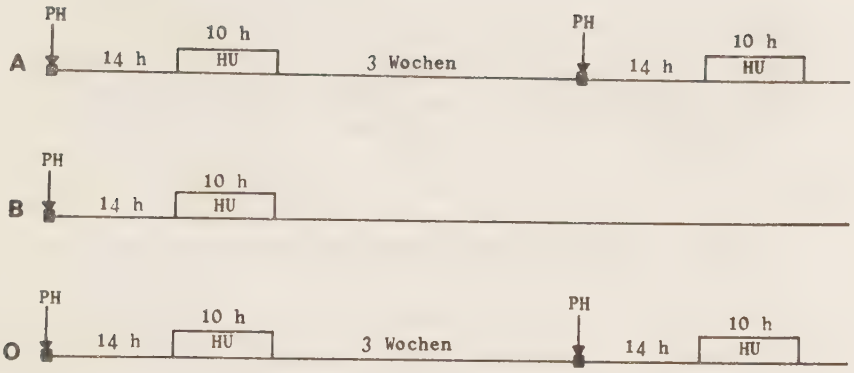


Abb. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Behandlungsgruppen.

Die Gruppe "A" wurde zweimal in einem Intervall von drei Wochen hepatektomiert (PH) und anschließend mit HU behandelt. Die Gruppe "B" wurde nur einmal behandelt. Die Gruppe "O" wurde ebenso wie die Versuchsgruppe "A" behandelt, aber als Kontrollgruppe zur Bestimmung der Überlebensrate verwendet.

In der Gruppe "B" wurde eine Zweidrittel-Hepatektomie durchgeführt, und 14 Stunden später wurden die Tiere zehn Stunden lang mit HU infundiert. Anschließend wurden die Ratten wie in der Gruppe "A" in einstündigem Abstand mit ^{3}H-TdR injiziert und eine Stunde später getötet.

Die Kontrollgruppe, bestehend aus zehn Ratten, wurde wie die Gruppe "A" behandelt, bekam jedoch kein ^{3}H-TdR. Diese Tiere wurden am Leben erhalten, um die Überlebensrate zu bestimmen.

Um eine Untersuchungsreihe von je 24 Ratten pro Gruppe "A" und "B" und 10 Ratten für die Kontrollgruppe zu bilden, mußten 97 Ratten operiert werden, da 39 Tiere aus verschiedenen Ursachen, meistens wegen einer paravenösen HU-Infusion, nicht verwendet werden konnten (Tabelle 1).

Tab. 1: Ausfall von Tieren während der Behandlungen.

	Gruppe "A" u. Kontrollgruppe "O"	Gruppe "B"
Ausfall bei Hepatektomie	5	0
Narkosezwischenfall bei der HU-Infusion	2	2
Kollabieren der Schwanzvene bei der HU-Infusion	1	10
Paravenöse HU-Infusionen	4	15

Nach Anfertigung der histologischen Schnitte wurde festgestellt, daß in sechs Tieren (drei Tiere der Gruppe "A" und drei der Gruppe "B") keine ^{3}H-TdR-Markierung nachweisbar war. Wahrscheinlich wurde bei diesen Tieren die ^{3}H-TdR-Injektion nicht exakt in die Bauchhöhle injiziert. Bei zwei Tieren, beide von der Gruppe "A",war das Leberparenchym durch venöse Stauung durch ein falsches Abbinden der Leberlappen geschädigt, sodaß sie für die Auswertung nicht verwendet werden konnten.

1.1.3. Partielle Hepatektomie

Die Tiere wurden zwischen 18:00 und 20:30 Uhr operiert. Die Operationen wurden aseptisch mit sterilisiertem Besteck und autoklaviertem Nähmaterial (Baumwollgarn Nr. 80, Firma MEZ Freiburg/Breisgau) durchgeführt.

Die erste Resektion wurde nach der Methode von Higgins und Anderson (1931) vorgenommen. Unter Äthernarkose wurde der Lobus medialis (pars dextra und sinistra) und der Lobus sinister lateralis entnommen, was Zweidritteln des Leberparenchyms entspricht (Anatomie nach Hoffmann 1956 - s.a. Abbildung 3).

Drei Wochen später wurde eine zweite Operation durchgeführt, bei der der Lobus dexter lateralis reseziert wurde. Zum Zeitpunkt dieser Operation wurden als Folge der ersten Hepatektomie bei einigen Tieren kleine Abszesse in der Hautnarbe beobachtet. Außerdem waren in der Bauchhöhle einiger Tiere geringe Verwachsungen der Leberkapsel mit dem Peritoneum und auch zwischen den Lappen zu beobachten, die sich stumpf lösen ließen.

Von den fünf bei dieser Operation ausgefallenen Tieren (Tabelle 1) handelte es sich in zwei Fällen um Narkosetod und bei den restlichen drei Tieren um Verbluten, das auf Schwierigkeiten beim Abbinden des Leberlappens und auch beim Lösen der Verklebungen zurückzuführen war.

Um eine gute Ligatur ohne venösen Stau in den übrigen Lappen zu sichern und möglichst viel Parenchym zu entfernen, wurde der Faden am hinteren Teil des Lobus dexter lateralis möglichst dicht an den Hilus herangeführt und am vorderen Teil mit der Schere etwa 4 mm vom Hilus entfernt eine kleine Inzision in das Gewebe vorgenommen. Während des Abbindens wurde die Durchblutung der übrigen

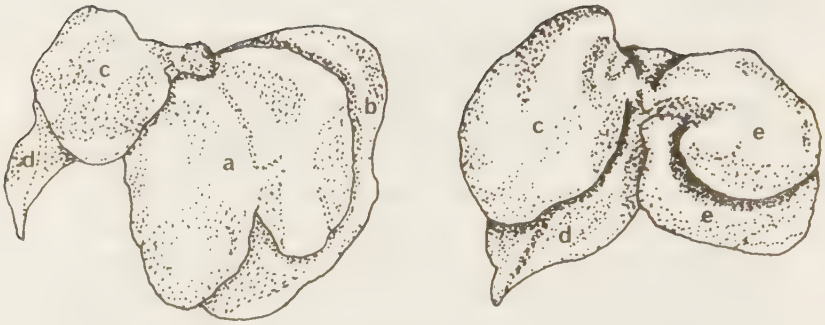


Abb. 3: Normale Rattenleber (linkes Bild) und regenerierte Leber nach Zweidrittel-Hepatektomie (rechtes Bild). a. Lobus medialis; b. Lobus sinister; c. Lobus dexter lateralis; d. Processus caudatus; e. Processus papillaris.

Die Leber wurde im gleichen Maßstab in der Aufsicht von ventral nach Isolierung aus dem Tier gezeichnet.

Abb. 4: Rattenleber nach Entfernung des Lobus dexter lateralis bei einem drei Wochen vorher zweidrittel-hepatektomierten Tier. Links 24 Stunden nach der Operation und rechts einen Monat nach der Operation mit vollständiger Regeneration.

Bezeichnung und Maßstab wie in Abbildung 3.

Lappen beobachtet. Gestaute Lappen färbten sich livide an, während ohne Stauung die rote Farbe des normalen Leberparenchyms erhalten blieb. Es wurden nur Tiere ohne Zeichen einer venösen Stauung weiterverwendet.

Der Lobus dexter lateralis wurde mit einer gebogenen Rundschere reseziert (Abbildung 4). Die geringe retrograde venöse Blutung wurde mit sterilisierten Tupfern entfernt und die Bauchhöhle zweischichtig vernäht.

1.1.4. Gewichtsbestimmung des resezierten Lobus dexter lateralis.

Für die Gewichtsbestimmungen der resezierten bzw. regenerierten Leberteile wurden Tiere von gleichem Alter und Gewicht wie die übrigen Versuchstiere und ebenso wie die Versuchstiere behandelt, verwendet.

Die Tiere wurden 14 Stunden nach einer Zweidrittel-Hepatektomie 10 Stunden lang mit HU infundiert. Drei Wochen danach, zum Zeitpunkt der zweiten Hepatektomie (Versuchsgruppe A), wurde eine Resektion des Lobus dexter lateralis in der beschriebenen Art (1.1.3) an fünf Ratten durchgeführt.
Nach der Hepatektomie wurden die Ratten getötet, die Leber entnommen, die Lappen voneinander getrennt und das gesamte Gewebe in 0,15 M Kochsalzlösung gewaschen. Danach wurde der Lobus dexter lateralis getrennt von den übrigen Lappen gewogen, um den Prozentanteil des Gewichtes dieses Lappens im Vergleich zum restlichen Lebergewebe zu bestimmen (Tabelle 2).

Die verschiedenen Leberlappen wurden anschließend einzeln in Aluminiumfolie im Brutschrank bei 70°C 18 Tage lang getrocknet, bis sie ein konstantes Gewicht erreicht hatten (s. Rabes et al., 1977).

Tab.2: Feuchtgewichtsbestimmung der regenerierten Leber drei Wochen nach Zweidrittel-Hepatektomie, zum Zeitpunkt der zweiten Resektion, bei der der Lobus dexter lateralis entnommen wurde.

Der Prozentanteil des Feuchtgewichtes des regenerierten Lobus dexter lateralis entspricht 41,4% des gesamten regenerierten Lebergewebes.

Tier Nr.	Gewicht (g)	Leber-gewicht (g)	Lobus dexter lateralis (g)	%
1	240	8,07	3,10	38,5
2	278	8,80	3,48	39,5
3	254	7,67	3,85	50,1
4	250	7,24	3,02	41,7
5	275	8,16	3,09	37,9
		$7,98 \pm 0,58$ [a]	$3,30 \pm 0,35$ [b]	

a) und b) Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung

Tab.3: Trockengewichtsbestimmung der regenerierten Leber drei Wochen nach Zweidrittel-Hepatektomie.

Das Trockengewicht des regenerierten Lobus dexter lateralis entspricht 42,2% der insgesamt regenerierten Leber. Das entsprechende Leberfeuchtgewicht der gleichen Tiere ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tier Nr.	Lebergewicht (g)	Lob. dex. lat (g)
1	2,14	0,85
2	2,54	1,02
3	2,20	1,12
4	2,12	0,90
5	2,37	0,90
	$2,27 \pm 0,17$ [a]	$0,96 \pm 0,10$ [b]

a) und b) Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung

Die Trockengewichtsbestimmungen ergeben, daß bei der zweiten Hepatektomie 42,2% der regenerierten Leber entfernt wurden (Tabelle 3).

1.1.5. Hydroxyharnstoff - Infusionen

Die Hydroxyharnstoff-Infusion wurde zwischen 8:00 und 10:30 Uhr, 14 Stunden nach partieller Hepatektomie, begonnen. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt mit dem Ziel, die größte Anzahl von Hepatozyten vor dem Beginn der DNS-Synthese-Phase, d.h. am Ende der G_1-Phase, zu treffen. Der G_1-S-Übergang erfolgt in Hepatozyten mit höchster Intensität zwischen 15 und 18 Stunden nach der partiellen Hepatektomie (Oehlert et al., 1962; Rabes et al., 1976; Stöcker, 1966; Rabes und Tuczek, 1970).

Eine HU-Infusion vor dem Übertritt in die S-Phase führt zu einer Akkumulierung am G_1-S-Übergang und damit zu einer Synchronisierung in diesem Teil des Zellzyklus.

Nach Freilegung und Kanulierung der Schwanzvene erhielt jedes Tier eine einmalige Injektion von 1,69 mmol HU/kg Hydroxyharnstoff (Hydroxyharnstoff, reinst, Fa. Serva, Feinbiochemica, Heidelberg), gelöst in physiologischer Kochsalzlösung. Darauf folgte eine zehnstündige Infusion (Perfusor IV, Venofix cannula Nr. 72500; Fa. Braun Melsungen, BRD) mit einer Dosis von 1,25 mmol/kg pro Stunde.
Diese Dosis ergibt nach einer Stunde eine HU-Konzentration von etwa 1,7 mM im Serum (Rabes et al., 1977).

Die Tiere waren in Macrolan-Einzelkäfigen untergebracht, hatten Zugang zu Wasser und Futter, lediglich der Schwanz war zur Befestigung der Infusionskanüle fixiert (Technik bei Iseler, 1977).

1.1.6. ^{3}H-TdR-Pulsmarkierung

Um die DNS-Synthese zu bestimmen, wurde Tritium-markiertes Thymidin (spezifische Aktivität 5 C/mM, Radiochemical Centre Amersham) verwendet.

Die Original-Lösung des ^{3}H-TdR wurde mit steriler physiologischer Kochsalzlösung auf eine Konzentration von 200 µCi/ml verdünnt und in einer Dosis von 0,8 µCi/g intraperitoneal injiziert. Eine Stunde nach der Injektion wurden mindestens 3 Tiere pro Zeitpunkt im Abstand von genau einer Stunde von der 1. bis 8. Stunde nach dem Ende der HU-Infusion durch Nackenschlag getötet und die Leber sofort entnommen.

1.1.7. Herstellung der histologischen Präparate und Autoradiographie.

Die entnommene Leber wurde in Scheiben von ca. 3 mm Dicke geschnitten und in 10% Formol unter Zugabe von 0,1 mg/ml inaktivem Thymidin fixiert. Nach Paraffineinbettung wurden 4 µ-Schnitte angefertigt, auf einen Objektträger aufgezogen und luftgetrocknet. Nach Entparaffinierung wurden die Schnitte in der Dunkelkammer bei 60% Luftfeuchtigkeit und 20% Raumtemperatur nach der Dipping-Methode (Amlacher, 1974; Steel, 1977) in eine fotoempfindliche Emulsion (Ilford K2, Essex, England) getaucht, die zuvor auf 45°C erwärmt und 1:1 mit Aqua dest. verdünnt worden war. Nach dem Beschichten wurden die Objektträger 2 Stunden luftgetrocknet, in lichtundurchlässige Kunststoffkästchen (Clay-Adams-Schachtel) gepackt und 7 Tage bei 4°C weiterhin in völliger Dunkelheit im Kühlschrank exponiert. Danach wurden die Schnitte 12 Minuten entwickelt, kurz gewässert, 3 - 5 Minuten fixiert und nochmals 20 - 30 Minuten unter fließendem Wasser gewässert. Nach einem letzten

Abspülen mit destilliertem Wasser wurden sie 24 Stunden luftgetrocknet und anschließend nach Harris gefärbt (Hämatoxylinlösung 30 Minuten, 20 Sekunden Differenzierung in 1% HCL-Alkohol, Wässern 20 Minuten, Gegenfärbung mit 0,5 % Eosin 3 Minuten, aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, Eindeckung mit Deckgläsern Nr. 0 in Eukitt).

1.1.8. Auswertung der Autoradiogramme

Die Auswertung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung (Ölimmersions-Objektiv 40-fach und Rasterokular 10-fach). Um den Background als Nullefekt in Rechnung zu setzen, wurde die nummerische Dichte der Silbergranula im Parenchym außerhalb der Zellkerne bestimmt. Ein Kern wurde dann als markiert gewertet, wenn über ihm mindestens die 2-fach höhere Anzahl von Silberkörnern als in der unspezifischen Hintergrundmarkierung (Background) enthalten waren.
Der Markierungsindex wurde regelmäßig im Processus caudatus bestimmt. Es wurden jeweils 5 x 1000 Hepatozyten meanderförmig ausgezählt.

Die intralobuläre Verteilung markierter Hepatozyten wurde wie folgt festgestellt:
Zu zwei Zeitpunkten (4. und 8. Stunde) nach Beendigung des HU-Blocks wurden von jeder Versuchsgruppe "A" und "B" 10 Leberläppchen ausgewertet. Die Präparate stammten von zwei Versuchstieren pro Zeitpunkt.

Für die Bestimmung des MI in verschiedenen Abschnitten zwischen Portalfeld und "Zentralvene" wurde mit Hilfe eines Rasterokulars im autoradiographischen Präparat die Fläche zwischen Portalfeld und "Zentralvene" eingestellt. Diese Fläche entsprach der Weite des Ge-

sichtsfeldes des Rasterokulars. Die Breite schwankte entsprechend der Größe des Leberläppchens. Um zehn Unterabschnitte auszuwerten, wurde die Breite der gemessenen Fläche mit einem Standard zehnmal unterteilter Lobuli verglichen und die entsprechende Fläche für 1/10 der Fläche des Unterabschnittes berechnet; die Hepatozyten wurden in diesen zehn Unterabschnitten gezählt und der Markierungsindex berechnet (Methode nach Wirsching, 1974).

1.2. Ergebnisse

In der zweimalig hepatektomierten und 14 Stunden nach jeder partiellen Hepatektomie 10 Stunden lang mit HU infundierten Versuchsgruppe "A" zeigt der Markierungsindex von Hepatozyten einen steilen Anstieg in den ersten Stunden nach Aufhebung des HU-Blocks. Während der MI eine Stunde nach der zweiten HU-Dauerinfusion ca. 6% beträgt, erreicht er ein Maximum von 68% markierter Hepatozyten in der 4. Stunde (Abbildung 5). Danach fällt die Kurve langsam bis auf 41% in der 8. Stunde ab.

Die Versuchsgruppe "B" (einmalig hepatektomiert und 14 Stunden danach während 10 Stunden mit HU infundiert), zeigt einen sehr ähnlichen Verlauf der Kurve des MI. Ein Maximum von 82% wird 4 Stunden nach Beendigung des HU-Blocks erreicht (Abbildung 6). Danach fällt er langsam bis auf 48% in der 8. Stunde ab. Der Anstieg der Kurve ist auch hier in den ersten Stunden steil.

In früheren Untersuchungen (Rabes et al., 1977) wurde in Versuchen mit einer 22-stündigen HU-Gabe ein Anstieg von 80% markierter Hepatozyten in der 4. Stunde nach dem HU-Block beobachtet.

Abb. 5: ^{3}H-TdR-Markierungsindex der Hepatozyten der zweimalig hepatektomierten und zweimalig HU-infundierten Gruppe A in einstündigen Abständen von der 1. bis 8. Stunde nach Aufheben der zehnstündigen HU-Infusionen, die 14 Stunden nach einer partiellen Hepatektomie gelegt wurden.
Die Ergebnisse sind von jeweils drei Tieren pro Zeitpunkt gewonnen. Der MI wurde in 5 x 1000 Hepatozyten pro Versuchstier berechnet. Mit diesen drei MI-Werten jedes einzelnen Tieres wurde der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet.

n* - ^{3}H-TdR-markierte Hepatozyten

n - Gesamtzahl der Hepatozyten

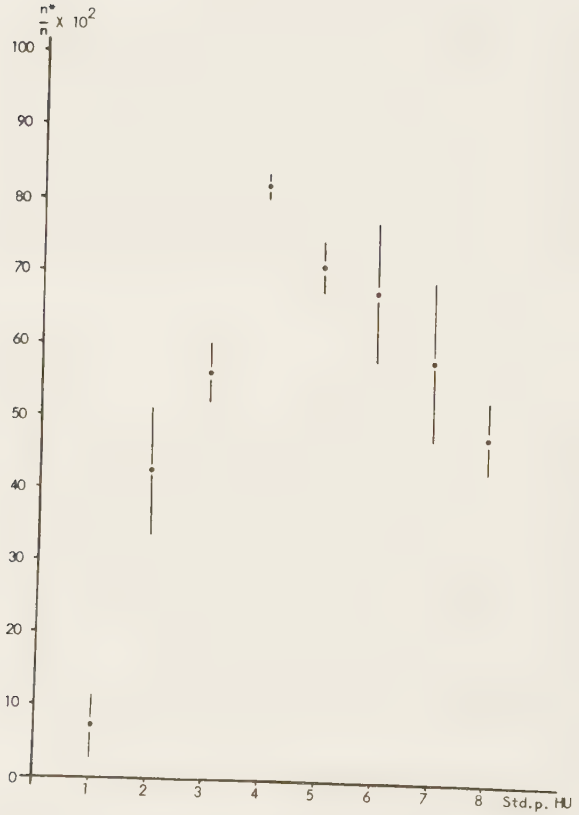


Abb.6: ^{3}H-TdR-Markierungsindex der Hepatozyten der Versuchsgruppe B, die 14 Stunden nach einer Zweidrittel-Hepatektomie 10 Stunden lang mit HU infundiert wurde. Die Ergebnisse wurden von der 1. bis 8. Stunde nach dem HU-Block wie in der Abbildung berechnet.

n* - ^{3}H-TdR-markierte Hepatozyten

n - Gesamtzahl der Hepatozyten

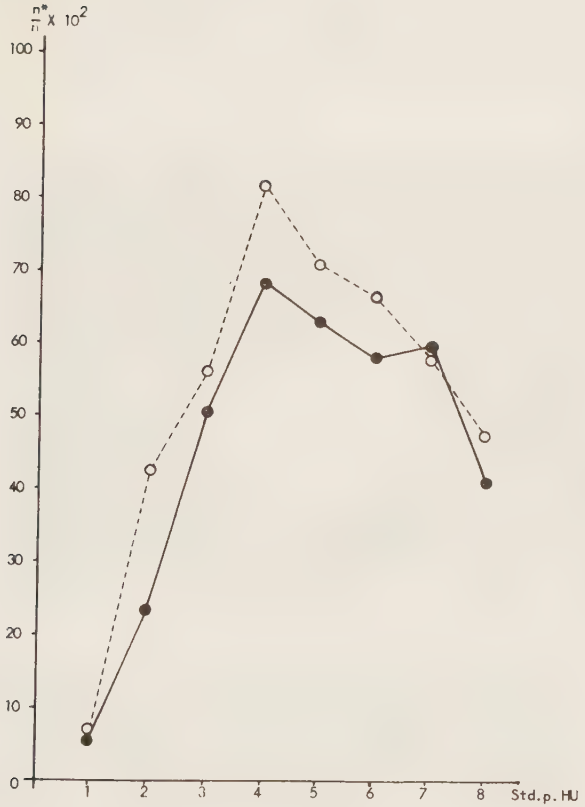


Abb. 7: Vergleich der Markierungsindices der Hepatozyten in beiden Versuchsgruppen.
Diese Abbildung zeigt den ähnlichen Verlauf der MI in beiden Gruppen, die in den Abbildungen 5 und 6 dargestellt sind. Aufgezeichnet sind hier die Mittelwerte der MI von jeweils drei Tieren in jeder Versuchsgruppe.

Gruppe "A"—●— , Gruppe "B"--○--

n^* - ^{3}H-TdR-markierte Hepatozyten

n - Gesamtzahl der Hepatozyten

Ein erhöhter "Background" ist in den Autoradiogrammen beider Gruppen in den ersten zwei Stunden nach dem HU-Block festzustellen (Abbildung 8).

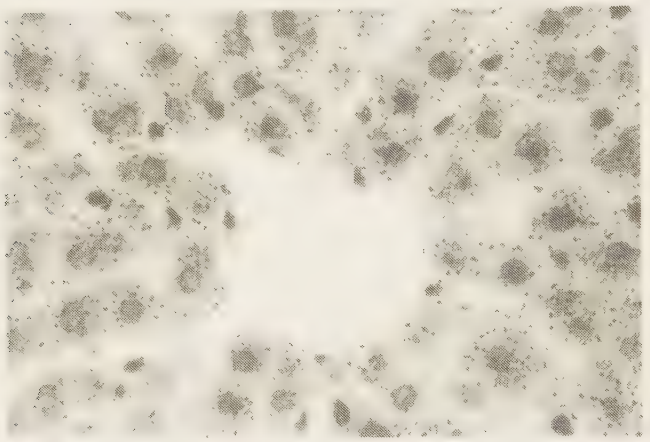


Abb. 8: Autoradiogramm eines Leberschnittes, der einen erhöhten Background im Parenchym in der Umgebung einer "Zentralvene" zeigt.
Das Gewebe stammt aus einem Versuchstier der Gruppe "A", das zwei Stunden nach der beendeten HU-Infusion aufgearbeitet wurde.
(Vergrößerung: 400-fach)

Das Verteilungsmuster ^{3}H-TdR-markierter Hepatozyten im Parenchym war ähnlich in beiden Versuchsgruppen. Ein in den ersten Stunden hoher Markierungsindex in der Nähe des Portalfeldes konnte wie in früheren Untersuchungen in physiologisch teil-synchronisierter (Tuczek und Rabes, 1973; Wirsching, 1974) und in der HU-synchronisierten Rattenleber (Rabes et al., 1977) auch hier in beiden Versuchsgruppen beobachtet werden.

Um eine quantitative Aussage zu erteilen, wurde das Leberläppchen in zehn Unterabschnitte unterteilt (s. 1.1.8) und der Prozentsatz ^{3}H-TdR-markierter Hepatozyten in jeder Gruppe bestimmt (Wirsching, 1974; Rabes et al., 1976).
Vier Stunden nach HU-Gabe, wenn die Anzahl von markierten Hepatozyten am höchsten ist, ist für beide Gruppen ein ähnliches Verteilungsmuster markierter Hepatozyten im Leberläppchen zu erkennen.

In den ersten Stunden nach HU-Block liegen die meisten markierten Hepatozyten im periportalen Bereich. In der 4. Stunde sind die Zellen im intermediären Bereich zwischen dem Portalfeld und T.H.V. (Terminaler Ast der vena hepatica - "Zentralvene" - Bezeichnung nach Rappaport, 1963; 1976) markiert (Abbildung 9).

In der 8. Stunde nach Hepatektomie ist der Markierungsindex in den ersten neun Abschnitten von periportal bis in den intermediären Raum nahezu konstant und fällt im 10. Teil, dem perivenösen Abschnitt, ab (Abbildung 10).

Bereits in Untersuchungen von Oehlert et al. (1962) wurde beschrieben, daß Mesenchymzellen und Endothelzellen von Gallengängen und Gefäßen erst später in die Synthese eintreten. Dies konnte auch hier beobachtet werden (Abbildung 11).

Die Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparate zeigen regelmäßig strukturiertes Leberparenchym. Zu beobachten ist eine mittelgradige Dilatation der "Zentralvene" mit mässigen Anzeichen von Stauung. In der Nachbarschaft der "Zentralvene" sind die Sinusoide etwas erweitert. Im Portalfeld kann man eine geringe Proliferation der Gallengänge sowie der Endothelzellen feststellen. Die Hepatozyten zeigen ein gleichmäßiges Zytoplasma sowie Kerne mit aufgelockertem Chromatin. Gelegentlich weisen die Kerne mehrere Nukleolen auf.

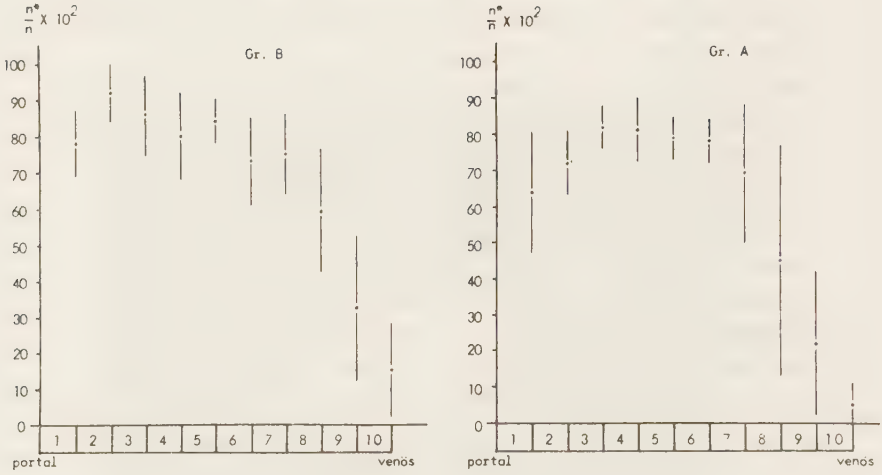


Abb. 9: Verteilungsmuster ^{3}H-TdR-markierter Hepatozyten im Leberläppchen 4 Stunden nach Aufheben des HU-Blocks.

Links die Auswertung der einmalig hepatektomierten und HU-infundierten Gruppe "B". Rechts die zweimalig hepatektomierte und HU-infundierte Gruppe "A".

Für die Auswertung wurden 10 Leberläppchen in 10 gleichgroße Abschnitte unterteilt (s. Material und Methodik); alle Hepatozyten wurden in diesen Unterabschnitten gezählt und daraus der MI berechnet. Die Punkte stellen den Mittelwert mit Standardabweichung der Auswertung von 10 Leberläppchen dar.

n^* - ^{3}H-TdR-markierte Hepatozyten

n - Gesamtzahl der Hepatozyten

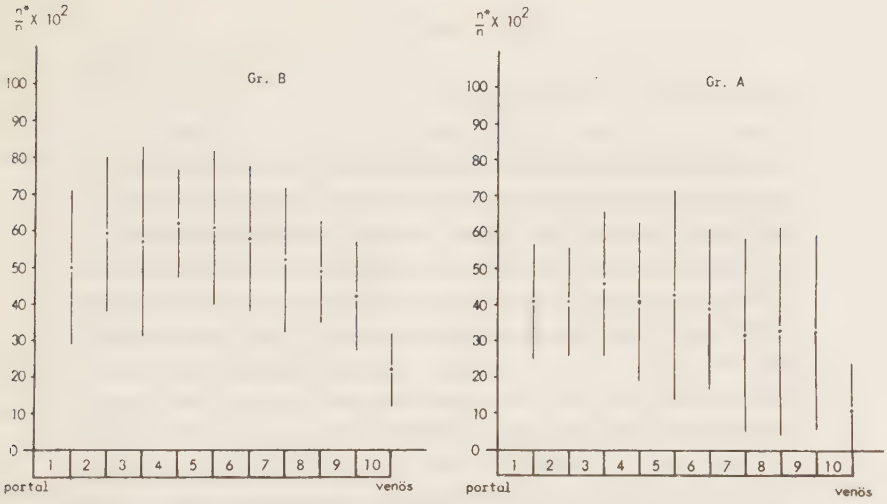


Abb. 10: Verteilungsmuster ^{3}H-TdR-markierter Hepatozyten im Leberläppchen 8 Stunden nach Aufheben des HU-Blocks.
Bezeichnung und Kriterien wie in Abbildung 9.

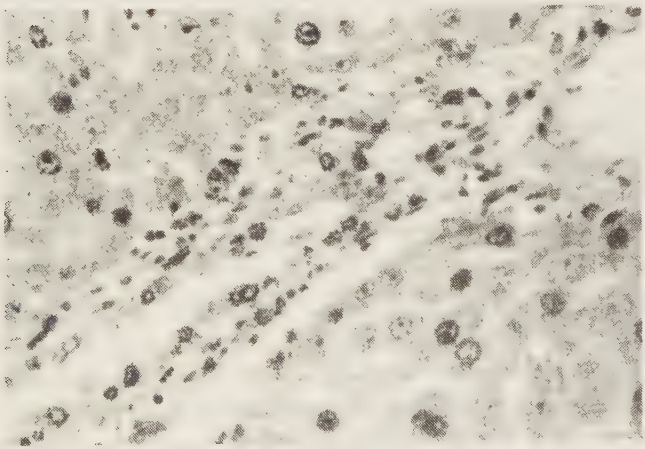


Abb. 11: Hohe Markierung der Nicht-Hepatozyten im Portalfeld bei einem Versuchtier der Gruppe "A" 8 Stunden nach HU-Gabe (Vergrößerung: 375-fach).

1.3. Besprechung der Ergebnisse

Nach den vorliegenden zellkinetischen Ergebnissen zeichnet sich ein ähnliches biologisches Verhalten in beiden Versuchsgruppen ab. Der ähnliche Verlauf des Markierungsindex (Abbildungen 5 und 6), das ähnliche Verteilungsmuster DNS-synthetisierender Hepatozyten im Leberläppchen (Abbildungen 9 und 10) sowie der verspätete Eintritt der Mesenchymzellen in die DNS-Synthese (Abbildung 11) sprechen dafür, daß die Leber auch nach wiederholter Teilresektion einen gleichartigen Regenerationsmodus aufweist. Der Regenerationsprozeß der Leber nach einer zweiten Teilhepatektomie, nach der noch 20% des ursprünglichen Lebergewebes übrig bleibt, verläuft ähnlich wie nach einer Zweidrittel-Resektion (Simpson und Finckh, 1963).

Der Funktionsverlust der Hepatozyten nach der Zweitresektion dürfte etwa in der gleichen Größenordnung wie nach einer Zweidrittel-Hepatektomie liegen (Bucher, 1967) und die Metabolisierung des HU in ähnlicher Weise wie nach der ersten Resektion erfolgen.

Mit einer HU-Dauerinfusion von 10 Stunden wird eine hohe Synchronisationsrate der DNS-Synthese erreicht. In der zweimalig hepatektomierten sowie zweimalig HU-infundierten Gruppe "A" befinden sich 68%, in der nur einmal nach partieller Hepatektomie HU-infundierten Gruppe "B" 82% gleichzeitig in DNS-Synthese.

Es ist anzunehmen, daß mit dieser relativ kurzen Infusionsdauer weniger Zellschädigungen auftreten als während langdauernder Infusionen.

Die hohe Zellsynchronisationsrate könnte auf eine geringere Auswirkung des "unbalanced growth", auf die Proliferationsfähigkeit der Zelle zurückzuführen sein

(Rabes et al., 1977; Schmidkonz, 1979), da die Infusionsdauer kurz war.

Der geringere Markierungsindex in der doppelt behandelten Gruppe "A" könnte auch auf die geringere Entnahme von Leberparenchym (42%) bei der zweiten Teilhepatektomie zurückzuführen sein (Bucher, 1967). Das Ausmaß von 42% reseziertem Leberparenchym bei der zweiten Hepatektomie dürfte an der unteren Grenze für hohe Regenerationsreize liegen (Rabes, 1976).

Ein weiterhin hoher Markierungsindex (42% in der Gruppe "A" und 47% in der Gruppe "B") auch noch in der 8.Stunde nach HU-Gabe könnte auf die Dauer der DNS-Synthese-Phase, die 7,3 bis 7,8 Stunden nach Zweidrittel-Hepatektomie beträgt (Stöcker, 1966; Rabes et al., 1975), zurückzuführen sein.

Nach einer Zweidrittel-Hepatektomie ohne weitere Eingriffe treten die Hepatozyten im normalen Verlauf ihrer Verteilung in einem hohen Prozentsatz bis zur 28. Stunde in die DNS-Synthesephase ein (Rabes et al., 1975). Dies ist der gleiche Zeitpunkt, zu dem in den vorliegenden Untersuchungen der Markierungsindex seinen Höhepunkt erreicht. Eine Erklärung für den hohen Markierungsindex könnte darin zu suchen sein, daß zu den synchronisierten Zellen sich andere summieren, die sich ohne Wirkung des HU im normalen Zellzyklustransit zu diesem Zeitpunkt in der S-Phase befinden.

Der nach Absetzen des HU normal weiter verlaufende Influx von zusätzlichen Zellen in die DNS-Synthese-Phase könnte auch eine Erklärung für den langsamen Anstieg des MI in den drei ersten Stunden und den ähnlich langsamen Abfall in den letzten Stunden des Versuches sein, der sich in den Kurven des MI (Abbildung 7) zeigt.

Eine weitere Erklärung für den langsamen Anstieg der Kurven bzw. die niederen Werte des Markierungsindex in den drei ersten Stunden nach dem HU-Block wäre darin zu sehen, daß sich während der HU-Infusionen ein großer Pool von Nucleosiden bildet, da lediglich die Umwandlung der Ribonucleoside in Desoxyribonucleoside durch HU inhibiert wird (Walters et al., 1973; Plagemann und Erbe, 1974). Bei Ende der Blockade stehen dann große Mengen von Vorläufern der DNS-Synthese durch Reaktivierung der Ribonucleosid-diphosphat-Reductase zur Verfügung, sodaß exogen zugeführtes ^{3}H-TdR nicht im Normalmaß für die DNS-Synthese inkorporiert wird. Im Autoradiogramm wären dementsprechend möglicherweise DNS-synthetisierende Zellen nicht mit Sicherheit zu erkennen, da die Markierungsdichte gering wäre.

Der höhere Background, wie er in den autoradiographischen Präparaten der ersten Stunden nach HU-Block nachzuweisen ist (Abbildung 8), kann als ein Hinweis für Veränderungen im normalen Metabolismus der Zelle zu deuten sein.

Im gesamten Versuchsverlauf kam es zu einem Ausfall von 41% der Versuchstiere (Tabelle 1). Dieser Wert erscheint hoch, doch ist zu berücksichtigen, daß mehr als die Hälfte der Tiere (Gruppe "A" und Kontrollgruppe "O") zweimal operiert und zweimal mit HU infundiert wurden.

Die Tatsachen, daß alle Kontrolltiere nach einem Jahr noch überleben, daß die histologische Struktur des Leberparenchyms gut erhalten ist, und daß weiterhin die Zellkinetik bei einfach wie doppelt behandelten Versuchstieren weitgehend identisch ist, sprechen dafür, daß das vorliegende Versuchsmodell mit doppelter Zellsynchronisation für Untersuchungen in vivo geeignet ist.

Daraus ergibt sich, daß sich mit diesem Modell Fragen des Zusammenhangs zwischen Zellproliferation und Carcinogenese unter neuen Aspekten untersucht werden können.

2. Untersuchungen zur Cancerogenese

2.1. Versuchsansatz

Ausgangspunkt für die Carcinogenese-Untersuchungen war das Versuchsmodell, dessen zellkinetische Grundlagen im ersten Teil dieser Arbeit analysiert wurden.

Die hepatektomierten und HU-behandelten Ratten wurden in vier Gruppen aufgeteilt (A, B, C und D, Abbildung 12). Tiere der Gruppe "A" wurden im Abstand von drei Wochen hepatektomiert; sie erhielten jeweils nach der Hepatektomie eine 10-stündige HU-Infusion und eine Stunde nach deren Absetzen eine Diäthylnitrosamin-Injektion (Abbildung 13). Drei Kontrollgruppen wurden gebildet. Tiere der Gruppe "B" wurden einmal hepatektomiert, 14 Stunden danach mit Hydroxyharnstoff infundiert und erhielten die erste Carcinogen-Injektion eine Stunde nach dem HU-Block und eine zweite 22 Tage danach. Tiere der Gruppe "C" wurden zweidrittel-hepatektomiert, mit Hydroxyharnstoff nach gleichem Muster wie die Tiere der Gruppe "B" behandelt und bekamen Diäthylnitrosamin einmalig eine Stunde nach Beendigung des HU-Blocks. Tiere der Gruppe "D" wurden weder hepatektomiert noch mit HU behandelt, bekamen aber im Abstand von 22 Tagen das Carcinogen in gleicher Dosis wie die Tiere der Gruppen "A" und "B".

2.2. Material und Methodik

2.2.1. Verwendetes Carcinogen und seine Applikation

Dialkylnitrosamine zeigen viele Vorteile für Untersuchungen auf dem Gebiet der chemischen Carcinogenese und finden dort eine weitverbreitete Anwendung (Druckrey et al., 1967; Magee et al., 1975; Farber, 1968).

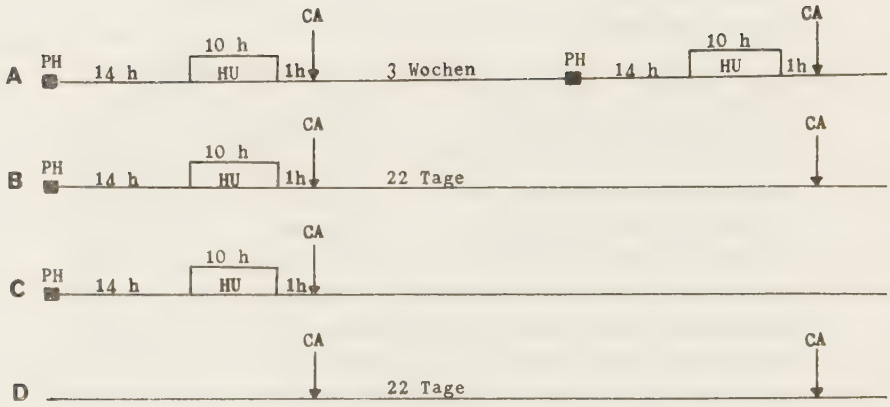


Abb. 12: Schematische Darstellung der verschiedenen Behandlungsgruppen.
Die Versuchsgruppe A wurde im Abstand von 3 Wochen partiell hepatektomiert (PH) und 14 Stunden danach 10 Stunden lang mit Hydroxyharnstoff (HU) infundiert. Eine Stunde nach dem HU-Block wurde jeweils das Carcinogen (CA) injiziert.

Die Gruppe B bekam zweimalig das Carcinogen, einmal nach PH und HU-Dauerinfusion und 3 Wochen später ohne vorherige weitere Eingriffe.
Die Gruppe C bekam einmalig das Carcinogen nach PH und HU-Synchronisation, während der Gruppe D zweimalig im Abstand von 22 Tagen ohne weitere Behandlung das Carcinogen verabreicht wurde.

Die Eigenschaften von Diäthylnitrosamin (DÄNA) sind von Bedeutung für Untersuchungen der Lebercarcinogenese (Côte, Oehlert und Büchner, 1962; Rabes et al., 1972). Die Wirksamkeit dieses Carcinogens bei Dauerbehandlungen ist von Druckrey et al. (1967) untersucht worden. 1977 wurde von Fridman-Manduzio und Mitarbeiter über eine erhöhte Lebertumorinzidenz durch eine einmalige DÄNA-Gabe nach partieller Hepatektomie berichtet.

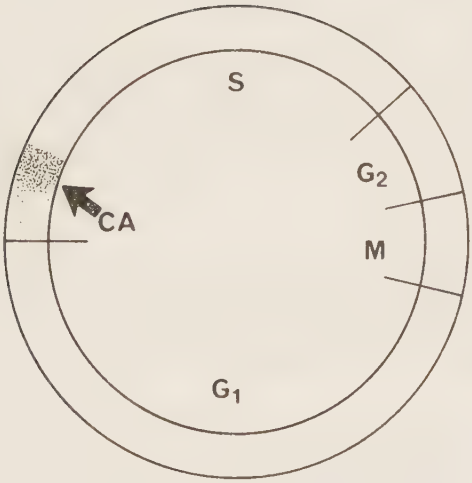
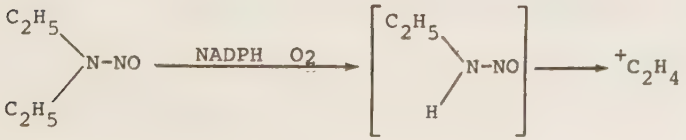


Abb. 13: Schematische Darstellung des HU-synchronisierten Zellzyklus.
Carcinogen-Gabe eine Stunde nach dem HU-Block in der frühen DNS-Synthesephase.

Es handelt sich um eine wasserlösliche Substanz, die sich schnell im ganzen Körper verteilt und rasch metabolisiert wird. DÄNA wird als Carcinogen erst aktiv nach Metabolisierung in der Leber. Über verschiedene Zwischenstufen entsteht ein Carbonium-Ion (Druckrey et al., 1967).



DÄNA ist also in seiner ursprünglichen Form als Pre-Carcinogen zu betrachten (Miller u. Miller,1971).
Von Vorteil für experimentelle Untersuchungen sind die starke carcinogene Wirkung der Substanz bei relativ geringer Toxizität und die Organotropie für die Leber. Zielzelle ist offenbar der Hepatozyt, denn es entstehen fast ausschließlich Parenchymtumoren bzw. Hepatocarcinome (Thomas, 1961).

Das Carcinogen (N-Nitroso-diäthylamin, rein 99%,SERVA Feinbiochemica, Heidelberg) wurde in kalter physiologischer Kochsalzlösung und in einer Dosis von 40 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert.

Die einmalige bzw. nach drei Wochen wiederholte intraperitoneale Injektion verursacht keine Dauertoxizität, und bei der verwendeten Dosis von 40 mg/kg Körpergewicht treten nur geringe toxische Nebenwirkungen auf.

2.2.2. Enzymhistochemische Reaktionen

90 Tage nach Behandlung wurden jeweils 2 Tiere und nach 6 Monaten 3 weitere Tiere jeder Versuchsgruppe getötet. Den Tieren wurde 24 Stunden vor der Leberentnahme das Futter entzogen.
Die Leber wurde sofort entnommen und durch Kohlensäure eingefroren. 6 μ dicke Kryostatschnitte wurden für die enzymhistochemischen Untersuchungen angefertigt. Die Schnitte aller Versuchsgruppen stammten stufenweise immer aus dem Processus caudatus und Processus papillaris. In Serienschnitten wurden die Aktivität der Adenosintriphosphatase (ATPase), der Glukose-6-Phosphatase und der γ-Glutamyl-Transpeptidase untersucht.

Der Nachweis von ATPase und Glukose-6-Phosphatase wurde mit der modifizierten Methodik von Wachstein und Meisel

(1957) erbracht. Beide Substrate (Adenosin-5'-triphosphat und Glukose-6-phosphat, Firma Boehringer, Mannheim) wurden in Aqua dest. gelöst und mit einer Lösung versetzt, die aus 0,2 M Tris-Maleat-Puffer (pH-Wert 7,5 für ATP; 6,5 für Glukose-6-Phosphat), 0,1 M Magnesium-Sulfat, 2% Bleinitrat und Aqua dest. bestand, gemischt und filtriert.

Die Präparate wurden 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Glasgeräte und Inkubationsmedium waren auf 37°C vorgewärmt. Nach Wässerung wurden die Schnitte 15 sec in H_2S entwickelt und nach Fixierung in 10% Formol und anschließender Wässerung mit Glyceringelatine eingedeckt.

Der Nachweis von γ-Glutamyl-Transpeptidase-Aktivität wurde nach der Methode von Rutenburg et al. (1968) durchgeführt. Das Inkubationsmedium bestand aus GMNA (γ-Glutamyl-4-methoxy-naphthylamid, SERVA Feinbiochemica, Heidelberg), 0,1 M Tris-Puffer (pH-Wert 7,4), 0,85% NaCL, Glycylglycin und Fast-Blue-BBN[5].

Die Inkubationszeit betrug 15 min bei 37°C. Die Glasgeräte wurden ebenfalls auf diese Temperatur vorgewärmt. Der Ablauf der Reaktion erfolgte in 0,85% NaCL (2 Minuten), Kupfersulfat (2 Minuten) und kurz wieder in 0,85% NaCL. Nach Wässerung der Schnitte in Aqua dest. wurde eine Kernfärbung mit Hämatoxylin (Hämalaun nach Mayer, Merck, BRD) vorgenommen. Anschließend wurden die Präparate mit Kaisers Glycerin-Gelatine eingedeckt. Die Reaktion bleib etwa 24 Stunden gut erhalten. Danach ist eine Verschollung der roten Färbung der Reaktion zu sehen, weswegen die Präparate in den ersten Stunden nach der Anfertigung ausgewertet und fotografiert werden mußten.

2.2.3. Beschreibung des halbautomatischen Planimetriegerätes

Die Auswertung der enzymhistochemischen Präparate erfolgte auf einem Videoplan Meßsystem (Firma Kontron, München). Dieses Gerät besteht aus einem Mikroprozessorgesteuertem Computer-System, in dem Daten verarbeitet und gespeichert werden können, einem Magnetmeßtablett und einem Auswertestift. Gekoppelt mit dem System sind ein Bildschirm und ein Drucker. Je nach eingestelltem Programm können verschiedene Messungen bzw. Auswertungen (Punktzählung, Planimetrie, Linearanalyse, stereologische Auswertungen usw.) durchgeführt werden.

Die Dateneingabe wird durch einen Mikroprozessor verarbeitet und das Ergebnis gespeichert. Die Auswertungen können auf dem Bildschirm verfolgt und auf Wunsch ausgedruckt werden.
Das Gerät ist außerdem mit einem Mikroskop verbunden, sodaß die Möglichkeit besteht, mikroskopische Parameter (Fläche, Anzahl oder Größe verschiedener Zellen usw.) in ähnlicher Weise wie auf dem Magnetmeßtablett auszuwerten. Für solche Auswertungen wird ein leuchtender Auswertestift, der auf dem Magnettablett frei beweglich ist, mittels eines Spiegels ins Gesichtsfeld des Mikroskops projiziert. So ergibt sich die Möglichkeit, daß der durch den Spiegel projizierte leuchtende Punkt im Gesichtsfeld des Mikroskops verfolgt werden kann, gesteuert durch die Bewegungen auf dem Magnetmeßtablett.

2.2.4. Auswertung der enzymhistochemischen Präparate

Der erste Schritt bei der Auswertung der ATPase-Präparate ist die Bestimmung der Gesamtfläche der einzelnen Schnitte pro untersuchtes Tier, um diesen Wert als

Referenzfläche für die weiteren Messungen benutzen zu können.
Da die Präparate größer als das Gesichtsfeld des Mikroskops sind, wurden diese Messungen mit Hilfe eines Projektionsgerätes durchgeführt. Die histologischen Schnitte wurden auf eine Fläche projiziert und der Schnitt auf Papier abgezeichnet. Der Vergrößerungsfaktor wurde berechnet und für die weiteren Untersuchungen in den Prozessor eingegeben.
Die Zeichnungen wurden dann auf dem Magnettablett mit dem Auswertestift umfahren und die Daten verarbeitet und gespeichert.

Nach diesen Messungen wurden die Schnitte im Mikroskop untersucht. Bezogen auf die Einstellungen des Mikroskops wurden neue Vergrößerungsfaktoren berechnet und diese in den Prozessor eingegeben. Anschließend wurden mit Hilfe eines Rasterokulars alle Schnitte meanderförmig untersucht. Die einzelnen ATPase-Defekt-Bezirke, die eine größere Fläche als 0,005 mm^2 aufwiesen (entsprechend der Fläche von 6 Hepatozyten) wurden unter Kontrolle des Auges mit dem Leuchtpunkt umfahren und die Ergebnisse im Prozessor verarbeitet und gespeichert.

Serienschnitte von Präparaten mit verschiedenen enzymhistochemischen Reaktionen und mit der entsprechenden Autoradiographie wurden unter einem Maskenvergleichsmikroskop (Leitz, Wetzlar) verglichen. Dieses Mikroskop besteht aus zwei getrennten Strahlengängen für kongruente Präparate, die auf synchron verschiebbaren Objekttischen justiert werden und in einem gemeinsamen Gesichtsfeld in einem Binokular vereinigt werden. Diese Form der Beobachtung ermöglicht den quantitativen morphologischen Vergleich von Serienschnitten mit verschiedenen Enzymreaktionen bzw. der Autoradiographie.

2.3. Ergebnisse und Besprechung

2.3.1. Untersuchungen der ATPase-Defekte 90 Tage nach Carcinogengabe

90 Tage nach der zweiten Carcinogengabe bzw. 90 + 22 Tage nach der ersten Gabe (Gruppe "C") wurden von jeweils zwei Tieren pro Versuchsgruppe Kryostatschnitte für die ATPase-Reaktion angefertigt.

In dieser ersten Untersuchungsserie wurden ATPase-Präparate mit einer Gesamtfläche von 10 cm^2 pro Gruppe ausgewertet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 dargestellt. Die Leber von Tieren der Versuchsgruppe "A", die zweimal HU-synchronisiert und nach jeder Synchronisation mit Carcinogen injiziert wurde, zeigt die höchste Anzahl der ATPase-Defektbezirke. Dieser Anteil entspricht 0,29% der untersuchten Gesamtschnittfläche von 10 cm^2 Lebergewebe. Tiere der Kontrollgruppe "B", die die gleiche Dosis Carcinogen bekamen, aber nur vor der ersten DÄNA-Gabe HU-synchronisiert worden waren, zeigen im Lebergewebe eine geringere Anzahl von Defektbezirken als die Gruppe "A", jedoch wesentlich mehr als Tiere der Gruppe "C", die einmalig mit DÄNA nach einer einmaligen HU-Gabe injiziert wurden, und somit nur die Hälfte der Dosis bekamen. Deutlich ist bei den Tieren der Gruppe "D" zu sehen, daß ohne Zellproliferationsreiz nur sehr wenige und sehr kleine ATPase-Defektbezirke zu sehen sind, obwohl die Tiere die gleiche Carcinogen-Gesamtdosis wie die Tiere der Gruppen "A" und "B" bekamen. Eine Klassifizierung der gemessenen Flächen nach Größe ist im Histogramm der Abbildung 14 dargestellt. Man kann an der Verteilung der ATPase-Defektbezirke erkennen, daß in der Versuchsgruppe "A" 90 Tage nach der letzten Behandlung

größere und auch Zahlreichere ATPase-Defektbezirke vorliegen.

Das Histogramm zeigt weiterhin einen deutlichen Zuwachs an Anzahl und Größe der ATPase-Defektbezirke nach zweimaliger Hydroxyharnstoff- und Carcinogen-Behandlung.

Tab. 4: Anteil der ATPase-Defekbezirke in Prozentanteilen zur untersuchten Gesamtfläche (Untersuchungen 90 Tage nach Behandlung).

Gruppe	Untersuchtes Gewebe (cm^2)	Anzahl	Mittlere Fläche (mm^2)	%
A	10	110[a)]	0,0165[b)] *(0,0050-0,3120)	0,29[c)]
B	10	81	0,0141 (0,0052-0,1247)	0,15
C	10	35	0,0116 (0,0049-0,0390)	0,04
D	10	11	0,0107 (0,0050-0,0202)	0,01

a) Anzahl der ATPase-Defektbezirke

b) Median *(Min.-Max.)

c) Prozentanteil der ATPase-defizienten Fläche in Bezug auf die Gesamtfläche von 10 cm^2.

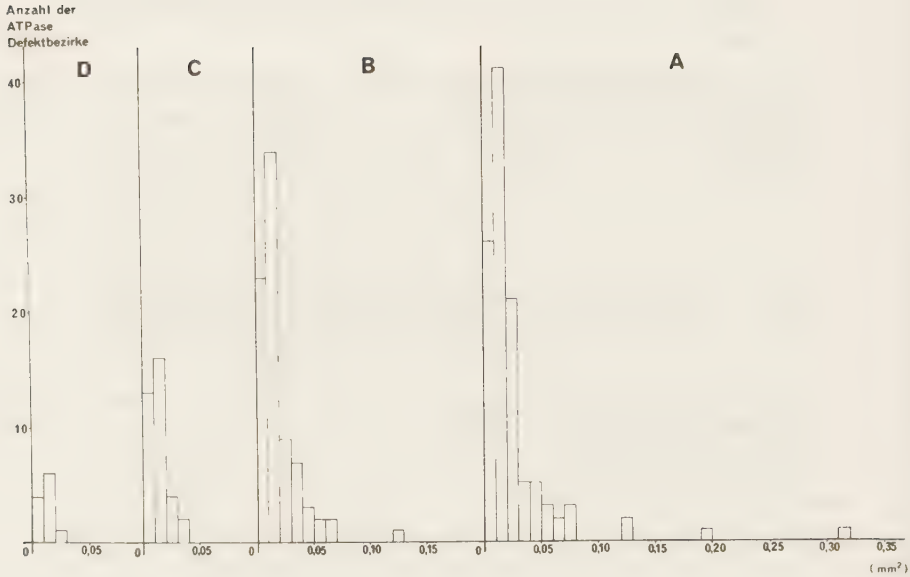


Abb. 14: Histogramm der Größe der ATPase-Defektbezirke 90 Tage nach der ersten Carcinogenexposition Gruppen A, B und D) bzw. nach der einmaligen Carcinogen-Gabe (Gruppe C).

Abszisse: Größenintervalle von 0,05 mm^2.

Ordinate: Absolute Anzahl der Defektbezirke pro 10 cm^2 untersuchtes Lebergewebe einer jeden Versuchsgruppe.

Die Gruppe A (zweimalig partiell hepatektomiert und mit HU synchronisiert) zeigt mehr und grössere ATPase-Defektbezirke.

2.3.2. Histochemische und morphometrische Untersuchungen sechs Monate nach Carcinogenexposition.

2.3.2.1. Enzymhistochemische Präparate

Jeweils drei Tiere jeder Versuchsgruppe (A, B, C und D; s.S. 29) wurden 180 Tage nach der erstmaligen Carcinogen-Behandlung untersucht. Die Kryostatschnitte stammten aus den zwei regenerierten Lappen, Processus caudatus und Processus papillaris.

Aus sieben verschiedenen Teilen wurden Gewebsstückchen von ca. 1,5 cm Durchmesser und 3 - 4 mm Dicke mit Kohlensäureschnee auf den Kryostattischchen eingefroren und Schnitte angefertigt.

Jeder erste und zweite Stufenschnitt wurde für die ATPase-Reaktion verwendet. In einer dritten Stufe wurden Serienschnitte hergestellt, wobei jeder erste Schnitt für die ATPase-Reaktion, jeder zweite für die Autoradiographie, jeder dritte für die Glukose-6-Phosphatase und jeder vierte Schnitt für die γ-Glutamyl-Transpeptidase-Reaktion verwendet wurde. In einer vierten Stufe wurde ein weiterer Schnitt für die ATPase-Reaktion angefertigt.

Der Abstand zwischen den verschiedenen Stufen betrug 200 μm.

Für die morphometrische Auswertung der ATPase-Defektbezirke wurden Schnitte der ersten und dritten Stufe gleichmäßig von beiden Lappen ausgewählt. Nur selten mußten Schnitte der Stufe zwei oder vier einbezogen werden, um eine Gesamtfläche von 10 cm^2 pro Versuchstier zu gewinnen.

Gemessen wurden - wie schon erwähnt - ATPase-Defektbezirke ab einer Fläche von 0,005 mm^2. Kleinere Einheiten hätten eventuell mit Artefakten verwechselt werden können und wurden daher nicht berücksichtigt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen für alle vier Gruppen sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt.

Alle Auswertungen sind hier auf eine Standard-Referenzfläche von 10 cm^2 Kryostat-Schnittfläche der Leber bezogen.
Die Anzahl der ATPase-Defektbezirke sowie die durchschnittliche Fläche dieser Bezirke ist, ebenso wie nach 90 Tagen, am größten in den Tieren der Gruppe "A". Die Untersuchungsergebnisse der Tiere der Gruppe "B" sind die, die sich am meisten der Gruppe "A" nähern. Die Tiere der Gruppe "C", die das Carcinogen nur einmal nach Hydroxyharnstoff-Synchronisation bekamen, zeigen eine geringere Anzahl sowie kleinere ATPase-Defektbezirke als die Tiere der Gruppen "A" und "B", jedoch wesentlich mehr und größere als die Tiere der Gruppe "D", die trotz zweimaliger Carcinogen-Gabe nicht hepatektomiert wurden und damit während der Carcinogenexposition einem Proliferationsreiz im Leberparenchym nicht ausgesetzt waren.

In Abbildung 15 ist für jedes einzelne Tier in den vier Gruppen das Histogramm der Größenverteilung der ATPase-Defektbezirke dargestellt.

Die prozentuale Häufigkeit der Bezirke bezogen auf einzelne Größenklassen ist in Abbildung 16 wiedergegeben.

Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde, die 90 Tage nach Behandlung erhoben wurden, daß die Anzahl und durchschnittliche Fläche der praeneoplastischen ATPase-Defektbezirke in der Versuchsgruppe "A" (nach zweimaliger Zell-Synchronisation und Carcinogen-Applikation in der DNS-Synthesephase) größer ist als die der Kontrollgruppe.

Tab. 5: ATPase-Defektbezirke in der Leber 180 Tage nach Carcinogen-Behandlung. Die Einzelwerte beziehen sich auf eine Standard-Schnittfläche von 10 cm^2.

Gruppe	Tier	Anzahl der ATPase-Defektbezirke	Mittelwert ± SE	Mittlere Fläche (mm^2)	Mittelwert ± SE (mm^2)	Flächenanteil (%)	Mittelwert ± SE
A	1	117[a]		0,0587[b]		0,68[c]	
	2	146	137±10	0,0521	0,0563±0,0021	0,76	0,76±0,05
	3	149		0,0581		0,86	
B	1	55		0,0513		0,28	
	2	109	91±18	0,0466	0,0463±0,0029	0,50	0,40±0,06
	3	109		0,0412		0,44	
C	1	60		0,0396		0,23	
	2	37	57±11	0,0490	0,0430±0,0029	0,18	0,23±0,03
	3	75		0,0406		0,30	
D	1	36		0,0175		0,06	
	2	37	43± 6	0,0214	0,0193±0,0011	0,08	0,08±0,01
	3	65		0,0190		0,10	

a) bezogen auf die untersuchte Gesamtfläche von 10 cm^2.

b) Mittlere Fläche der einzelnen ATPase-Defektbezirke (arithmetischer Mittelwert).

c) $\frac{\text{ATPase-Defektfläche } cm^2}{10\ cm^2} \times 100$

Tab. 6: Signifikanzberechnungen (t-Test) verschiedener Parameter in den einzelnen Versuchsgruppen A, B, C und D.

Anzahl der ATPase-Defektbezirke:

	B	C	D
A	0,05	0,0025	0,0005
B		0,10*	0,025
C			0,15*

Mittlere Fläche der einzelnen ATPase-Defektbezirke:

	B	C	D
A	0,025	0,0125	0,0005
B		0,25*	0,0005
C			0,0005

Prozentualer Flächenanteil:

	B	C	D
A	0,01	0,0005	0,0005
B		0,05	0,005
C			0,01

Statistisch nicht signifikant (*) waren:

1) bei der Anzahl der ATPase-Defektbezirke die Unterschiede zwischen der Gruppe B und C, sowie zwischen den Gruppen C und D;
2) bei der mittleren Fläche der einzelnen ATPase-Defektbezirke die Unterschiede zwischen Gruppe B und Gruppe C.

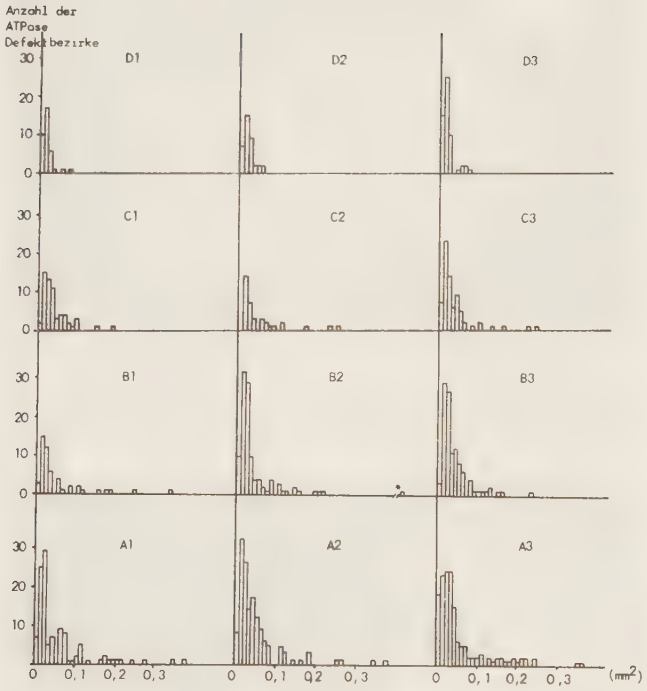


Abb. 15: Anordnung der ATPase-Defektbezirke der einzelnen Versuchstiere in den 4 Behandlungsgruppen in Abhängigkeit von der Größe, bezogen auf eine Standardfläche von 10 cm^2 pro Versuchstier.

Untersuchungen 180 Tage nach Carcinogen-Behandlung.

Abszisse: Größe der Bezirke in einem Intervall von 0,01 mm^2.

Ordinate: Absolute Anzahl der ATPase-Defektbezirke.

(* 0,74 mm^2)

Abb. 16: Prozentualer Anteil der ATPase-Defektbezirke in den verschiedenen Versuchsgruppen, dargestellt als Größen-Histogramm mit einem Intervall von 0,1 mm^2 (Abszisse). Die Gesamtzahl aller Enzymdefektbezirke der 4 Gruppen A - D wurden = 100% gesetzt.

Die Ergebnisse stammen aus Untersuchungen 180 Tage nach der ersten Carcinogenexposition (Gruppen A, B u. D) bzw. nach der einmaligen Carcinogengabe (Gruppe C).

Die durch HU-Gabe nach partieller Hepatektomie zweimalig synchronisierte Gruppe A zeigt zahlreichere und größere ATPase-Defektbezirke als die Kontrollgruppen.

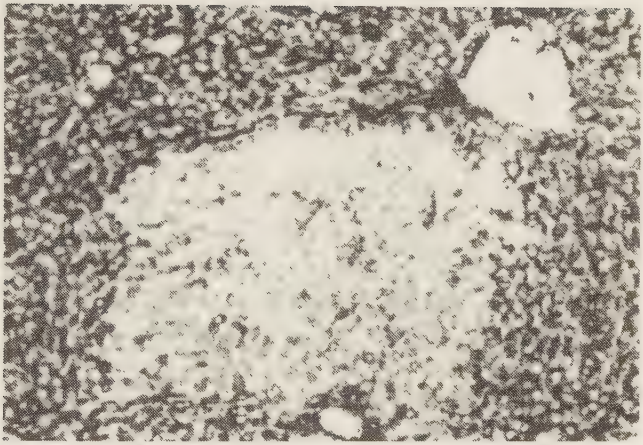


Abb. 17: ATPase-Defektbezirk im intermediären Bereich des Leberläppchens (Vergrößerung: 150-fach).

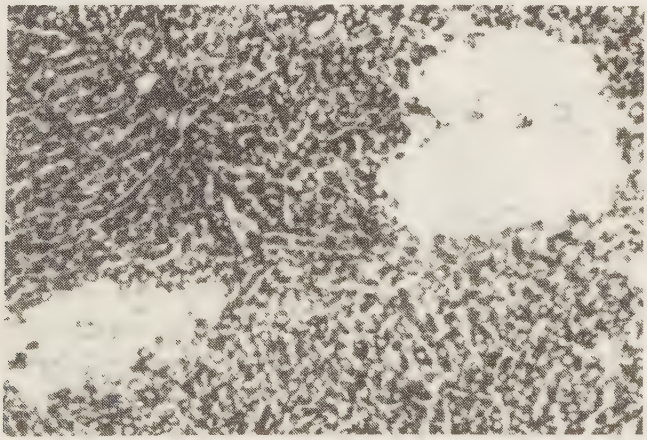


Abb. 18: ATPase-Defektbezirke dicht nebeneinander. Versuchsgruppe A 180 Tage nach Behandlung (Vergrößerung: 150-fach).

2.3.2.2. Untersuchungen an ATPase-, Glukose-6-Phosphatase- und γ-Glutamyl-Transpeptidase-Serienschnitten im Maskenvergleichsmikroskop.

Enzymreaktionen an den Leberschnitten sowie die Vergleichsautoradiographien wurden unter einem Maskenvergleichsmikroskop (s.S. 35) analysiert. Der Vergleich zwischen ATPase- und Glukose-6-Phosphatase-Präparaten zeigt, daß ATPase-Defekte meist mit einem Glukose-6-Phosphatase-Defekt übereinstimmen, doch gibt es von dieser Regel gelegentlich Ausnahmen. Man beobachtet auch ATPase-Defektbezirke, in denen der kongruente Leberanteil, der einem Glukose-6-Phosphatase-Ausfallsbezirk entsprechen würde, sich als nur schwach defizient herausstellt, nur angedeutet vorliegt oder auch überhaupt nicht nachweisbar ist (Abbildung 19).

Der Vergleich zwischen ATPase und γ-Glutamyl-Transpeptidase entspricht den Beobachtungen von Pugh und Goldfarb (1978) insofern, daß Bezirke, die γ-Glutamyl-Transpeptidase-positiv sind, nicht immer einem ATPase-Defektbezirk entsprechen, obwohl diese Beobachtung am häufigsten ist. Andererseits erkennt man Bezirke, die γ-Glutamyl-Transpeptidase-positiv und ATPase-negativ sind, in ihrer Ausdehnung aber nicht vollkommen übereinstimmen (Abbildung 20). Hier könnte es sich um Subpopulationen von Zellen mit unterschiedlichem Wachstum handeln. Es ist bekannt, daß praeneoplastische Bezirke, die ATPase- und Glukose-6-Phosphatase-Defizienz aufweisen, Zellpopulationen enthalten können, die schneller als rein ATPase-defiziente Subpopulationen wachsen (Rabes et al., 1972).

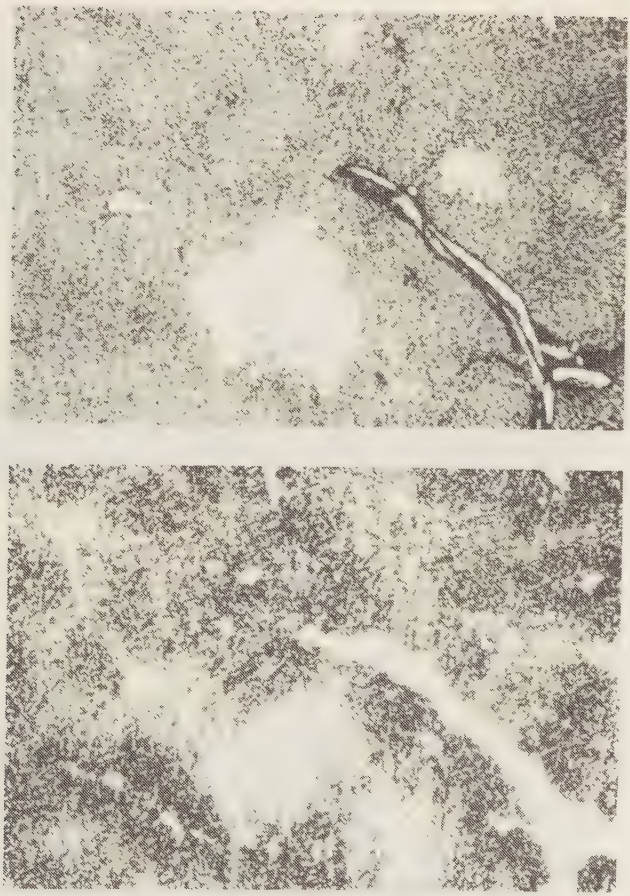


Abb. 19: Vergleich einer ATPase-Reaktion (oben) mit einem entsprechenden Glukose-6-Phosphatase-Serienschnitt (unten).

Die ATPase-Defektbezirke sind in der Regel deutlich vom übrigen Parenchym abgrenzbar, während die Glukose-6-Phosphatase-Defekte gelegentlich nicht scharf abgegrenzt oder überhaupt nur schwach nachweisbar sind (Vergrösserung: 25-fach).

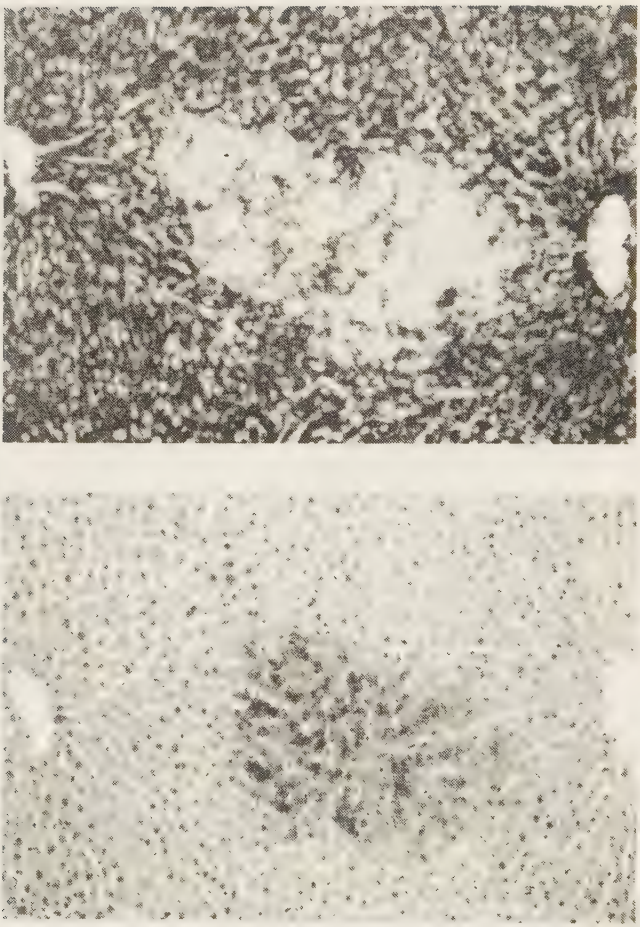


Abb. 20: Vergleich einer ATPase-Reaktion mit der entsprechenden γ-Glutamyl-Transpeptidase-Reaktion im Serienschnitt (Vergrößerung: 100-fach).

2.3.2.3. ATPase-Präparate und Autoradiographie im Maskenvergleichsmikroskop

Um die Frage der klonalen Wachstumsaktivität in praeneoplastischen Enzym-defizienten Bezirken der Leber genauer analysieren zu können, wurden Serienschnitte mit ATPase-Reaktion und die konsekutive Autoradiographie nach einmaliger Injektion von ^{3}H-TdR verglichen.

Ziel der Untersuchungen war, im Maskenvergleichsmikroskop eine Kongruenz der ATPase-Defekte ab einer Größe von 0,05 mm^2 an mit den entsprechenden Leberbezirken im Autoradiogramm herzustellen und in den Autoradiogrammen selektiv für diese praeneoplastischen Bezirke eine Aussage über die Zellkinetik nach einer einstündigen Pulsmarkierung zu machen.
Auffallend war, daß praeneoplastische Bezirke sich in der Regel schon morphologisch vom übrigen Parenchym unterscheiden (s.S. 23). Eine Zellpolymorphie mit meist hellem Zytoplasma und gering vergrößerten Kernen war vorhanden (Abbildungen 24 und 25). Der Markierungsindex war in den ATPase-Defektbezirken deutlich höher als im übrigen Parenchym (Abbildungen 21 und 22).

Die Bestimmung des MI erfolgte in jeweils 20 ATPase-Defektbezirken der Gruppen "A" und "B". In jedem dieser Bezirke,die eine Größe zwischen 0,05 und 0,4 mm^2 hatten, wurden sämtliche Hepatozyten gezählt. Die ^{3}H-Thymidin-markierten Hepatozyten wurden für jeden Defektbezirk als Fraktion der Gesamtzellzahl dieses Bezirks bestimmt.

Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, ergab sich zwischen beiden Gruppen in der Zellproliferation keine signifikante Differenz. Es war jedoch auffällig, daß kleinere Enzym-Defektbezirke in der Regel einen geringeren Markierungsindex aufweisen als größere Herde.

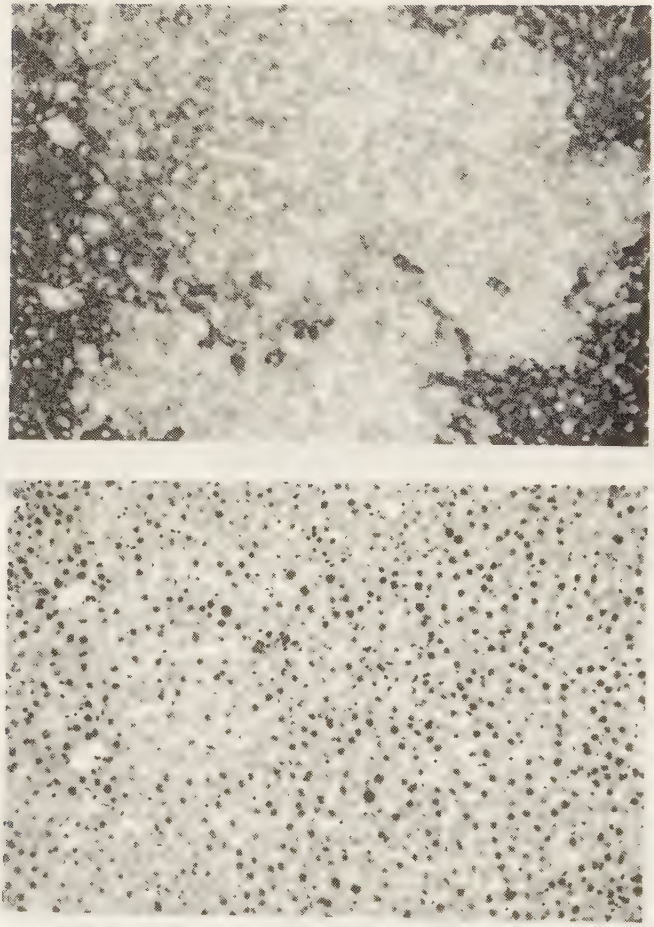


Abb. 21: ATPase-Defektbezirk (oben) mit dem entsprechenden Autoradiogramm (unten) im Serienschnitt.
Beide Abbildungen 100-fach vergrößert.
Ausschnitt markierter Zellen in Abbildung 22.

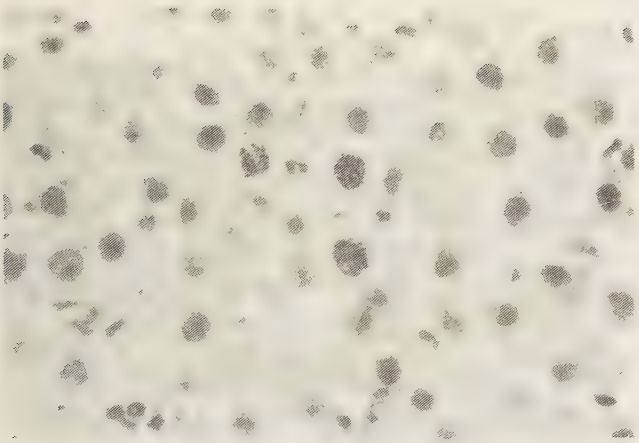


Abb. 22: Ausschnitt aus Abbildung 21, in dem man die erhöhte Markierung der Zellen in den ATPase-Defektbezirken erkennen kann (Vergrößerung: 400-fach).

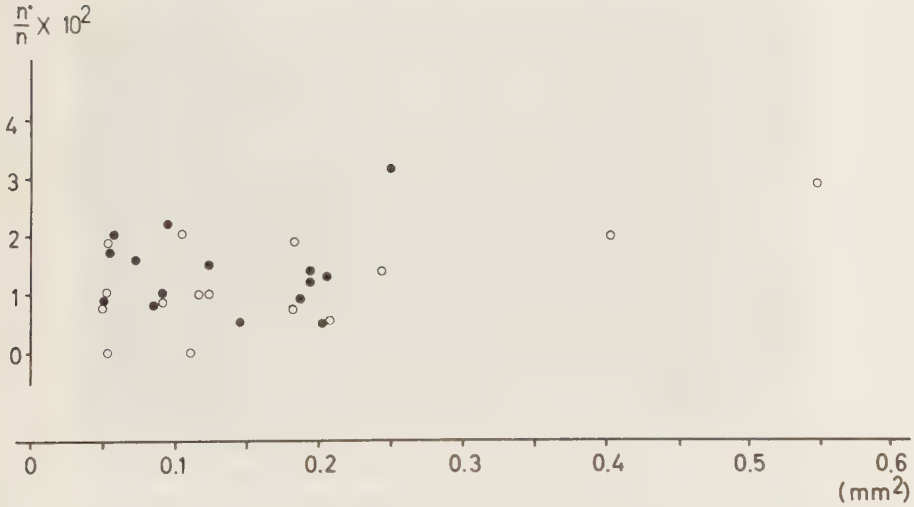


Abb. 23: Prozentanteil ^{3}H-TdR-markierter Zellen als Funktion der Größe der praeneoplastischen Bezirke. Der MI ist darin erhöht. Zwischen beiden Versuchsgruppen A (●) und B (○) besteht jedoch kein signifikanter Unterschied.
Abszisse: Größe der praeneoplastischen Bezirke.
Ordinate: MI (n* = Anzahl ^{3}H-TdR-markierter Zellen; n = Gesamtzahl der Zellen in einem Bezirk.

2.3.2.4. Morphologie der praeneoplastischen Bezirke

Kleinere praeneoplastische Bezirke (Fläche zwischen 0,05 und 0,4 mm^2), die in Übereinstimmung mit ATPase-Defektbezirken festgestellt wurden, zeigen meist große klarzellige Zellen, die, wie in anderen Untersuchungen festgestellt wurde (Bannasch, 1968), reichlich Glykogen enthalten.

Größere Bezirke von einer Größe von etwa 0,4 mm^2 an enthalten oft bereits geringgradig polymorphe Hepatozyten. Man beobachtet dort außer Klarzellen noch "eosinophile" und "basophile" Zellen (Bannasch, 1976) mit immer deutlicherer Abgrenzung und Kompression des übrigen Parenchyms (Abbildung 25).

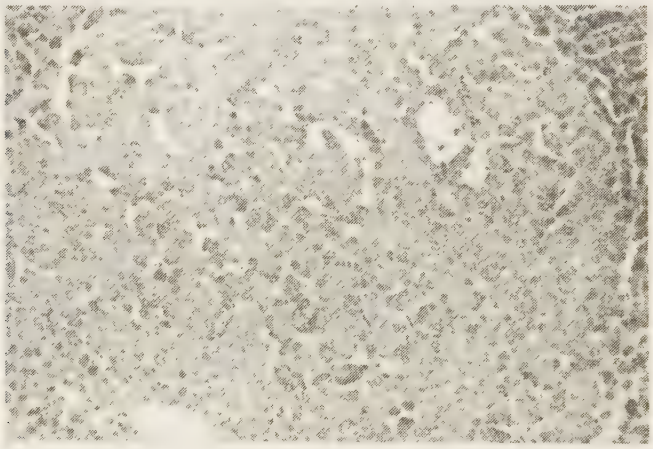


Abb. 24: Hyperplastischer Herd mit einer Querschnittfläche von 0,4 mm^2, gut vom übrigen Parenchym abgegrenzt. Man erkennt die vergrößerten Zellen mit hellem Zytoplasma.

Versuchstier der Gruppe B, 6 Monate nach Behandlung (Vergrößerung: 100-fach).

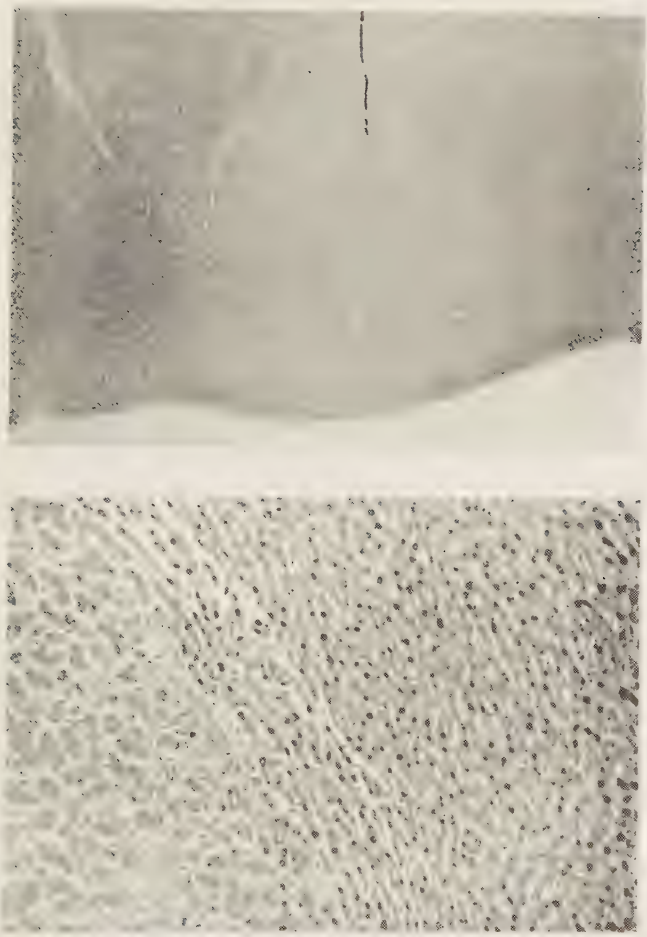


Abb. 25: Hyperplastischer Knoten mit einer Querschnittfläche von 1,7 mm^2. Die Kompression des normalen Leberparenchyms ist deutlich zu sehen.

Befund bei einem an Bronchopneumonie gestorbenen Tier der Versuchsgruppe A, 6 Monate nach Carcinogen-Behandlungen: oben 25-fach, unten 100-fach).

C. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Die Versuche, über die in der vorliegenden Arbeit berichtet wird, sollen zur Klärung des Problems einer Korrelation zwischen Zellzyklusposition und Carcinogenempfindlichkeit der Zielzellen beitragen.

Um diese Frage mit quantitativen Methoden bearbeiten zu können, wurde ein neues experimentelles Modell mit zweimaliger Zellsynchronisation entwickelt, wie es im ersten Teil der Arbeit dargestellt wird.

Aufgrund der zellkinetischen Untersuchungen nach zweimaliger partieller Hepatektomie in Abständen von 22 Tagen und jeweils anschließender HU-Synchronisation der DNS-Synthese ergibt sich, daß die Rattenleber zu wiederholten Regenerationsvorgängen in der Lage ist, wie dies bereits von Simpson und Finckh (1963) beschrieben wurde, daß aber darüber hinaus auch die Zellzyklusposition der Hepatozyten zu definierten Intervallen nach Regenerationsreiz vereinheitlicht werden kann. Damit ist über die bisher entwickelten experimentellen Modelle von synchronisierten Zellen in vivo (Rajewsky et al., 1971; Rabes et al., 1975) erstmals die Möglichkeit gegeben, Carcinogenexposition in definierten Zellzyklusphasen wiederholt vorzunehmen.

Dieses Modell hat damit den Vorteil, möglicherweise bei genauem "Timing" der Carcinogenexpostion Zielzellen im gleichen Abschnitt des Zellzyklus mehrfach zu treffen.

Der Effekt dieser zellzyklusbezogenen carcinogenen Doppelexposition läßt sich prinzipiell am besten durch Bestimmung von Tumorinzidenzraten abklären. Da das Intervall bis zur möglichen Entstehung von Tumoren jedoch sehr lang ist, wurde in der vorliegenden Arbeit ein anderes Kriterium für die Initiationswirkung angewendet. In der Leber entstehen bereits kurz nach Carcinogenex-

position enzymdefiziente praeneoplastische Subpopulationen (Gössner udn Friedrich-Freksa, 1964; Schauer und Kunze, 1968; Scherer et al., 1972; Kitagawa und Sugano, 1973) in direkter Korrelation zur Wahrscheinlichkeit späterer Tumormanifestierung (Rabes et al., 1972; Scherer und Emmelot, 1976; Pitot et al., 1978; Pugh und Goldfarb, 1978).

Die Untersuchungen dieser praeneoplastischen Läsionen mit Anwendung des semiautomatischen Planimetriegerätes bieten die Möglichkeit, die Läsionen nach Fläche und Zahl quantitativ mit geringerem Zeitaufwand zu erfassen und außerdem mit Hilfe des geschilderten Maskenvergleichsgerätes auch Korrelationen zwischen mehreren histologischen, enzymhistochemischen, autoradiographischen und zytologischen Parametern dieser Läsionen zu analysieren.

Eine Verkürzung der Latenzperiode zwischen Initiation und Expression des malignen Wachstums ist in Dauerversuchen bzw. kontinuierlichen Gaben von Carcinogenen Stoffen bekannt. In Dauerversuchen mit Diäthylnitrosamin ist die Korrelation zwischen Dosis und Latenzzeit bis zum Auftreten von Lebertumoren mit großer Genauigkeit darstellbar (Druckrey et al., 1967). Die exogene Wirkung der Carcinogene läßt sich in solchen Versuchsmodellen gut darstellen.

Die zahlreichen endogenen Faktoren, die bei der Cancerisierung eine Rolle spielen, sind noch zum großen Teil unbekannt. In Versuchen mit einmaliger Carcinogen-Gabe (Stopversuche) sind viele Vorgänge noch unklar, insbesondere in der Phase zwischen Initiation und Expression des malignen Wachstums. Es ist bekannt, daß die Wirkung eines Carcinogens auf die Zelle zu Veränderungen im Genom führt. Ein Teil dieser promutagenen

Läsioen ist reversibel, da die Zelle über Reparaturmechanismen verfügt (Hanawalt und Setlow, 1975), die zu einer entweder vollständigen Restitutio ad integrum führen, z.B. short patch repair (Hnawalt et al., 1979), oder aber auch Läsionen mit Fehlern (error-prone repair) (Radman, 1975) korrigieren.

Die Latenzperiode zwischen Carcinogen-Applikation bis zur Entstehung des Tumors ist bei diskontinuierlicher Carcinogen-Gabe in der Regel sehr lang. Eine Verkürzung dieser Zeit ist durch Anwendung von sehr hohen Dosen Diäthylnitrosamin in hepatektomierten Ratten gelungen (Solt und Farber, 1976). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, daß in der Leber nach einer solchen Behandlung eine "selektive Cytotoxizität" zustande kommt, und daß nicht toxisch geschädigte Zellen einen Wachstumsvorteil aufweisen und sich zu Tumoren entwickeln.

Eine andere Möglichkeit, diese Latenzperiode zu verkürzen, ist ein Versuchsmodell, in dem nach einer einmaligen initierenden Carcinogen-Gabe Substanzen gegeben werden, die allein keine carcinogene Wirkung zeigen, sondern nur tumorpromovierend wirken (Berenblum, 1975).

Bei der Bewertung der vorliegenden Versuchsergebnisse, die sich auf die Korrelation zwischen der Carcinogenese und Position der Zelle im Zellzyklus konzentrieren, sollten daher auch andere Faktoren, die für den Verlauf der praeneoplastischen Latenzperiode und für die maligne Transformation bzw. Progession wichtig scheinen, nicht vergessen werden (Pitot und Heidelberger,1963; Foulds, 1965; Miller, 1970; Berenblum, 1975; Miller, 1978).

Ein zweimaliger Proliferationsreiz mit anschließender Zellsynchronisation in vivo, in der jeweils Zellen in der DNS-Synthesephase einer carcinogenen Wirkung ausgesetzt werden, dürfte zu einer höheren Inzidenz von

von praeneoplastischen Läsionen und zu verstärkter Tumorinzidenz führen, wenn durch diese zweite Behandlung eine größere Anzahl von Zellen oder bereits initiierte Zellen erneut getroffen werden. Hierbei sollte die Bedeutung von genetischen Faktoren beachtet werden (Magee et al., 1975). Die erste Carcinogen-Gabe könnte zu einer Läsion im Genom führen, die sich als rezessive Veränderung darstellt, ohne zu einer Expression der malignen Transformation zu führen. Erst eine zweite Behandlung könnte die rezessiv, d.h. latent veränderten Zellen erneut schädigen und ähnlich wie bei der Aktion von Promotoren dann zur Expression der malignen Transformation führen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß derartige Überlegungen realistisch sein könnten: Eine zweimalige Carcinogen-Gabe an Ratten während der synchronisierten DNS-Synthesephase führt zu einer signifikant erhöhten Zahl von praeneoplastischen Herden im Vergleich zu Ratten, die ohne Proliferationsreiz, ohne Zellzyklussynchronisation und mit der gleichen Dosis des Carcinogens behandelt wurden.

Das gleiche gilt für Ratten, die nur einmal partiell hepatektomiert und deren Leberzellen nur einmal im Anschluß an diese Operation synchronisiert wurden, die das Carcinogen jedoch sowohl während der synchronisierten DNS-Synthesephase als auch ein zweites Mal während einer Proliferationsruhe erhielten.

Diese Versuchsergebnisse belegen, daß Zellen, die während eines definierten Zellzyklusabschnittes zweimal mit Carcinogen exponiert werden, eine stärkere Transformationsfrequenz aufweisen als carcinogenexponierte Zellen ohne Proliferation bzw. nach nur einmaliger Proliferationsanregung.

Es wurde beschrieben, daß bei alkylierenden Carcinogenen, insbesondere Methylnitrosoguanidin, Mutationen im Genom an der Stelle auftreten, wo sich die DNS in Form der Replikationsgabel in der Phase der Reduplikation befindet (Cerda-Olmedo et al., 1968; Hince und Neale, 1977). Doppelte Exposition zum gleichen Zeitpunkt der S-Phase könnte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, daß die Verteilung der Mutationen nicht rein stochastisch erfolgt, sondern homologe Abschnitte der Parental- bzw. Tochterstränge der DNS vermehrt Läsionen zeigen. Damit könnte aus einer an sich rezessiven Läsion eine Manifestierung denkbar werden, ohne daß unbestimmte "Realisationsfaktoren" im Sinne von Promotoren erforderlich wären.

Einschränkend zu dieser Hypothese ist jedoch zu bemerken, daß in diesen Versuchen zwar ein höherer Prozentsatz von praeneoplastischen Läsionen in der doppelt behandelten Gruppe "A" im Vergleich zur Gruppe "B" entsteht, die Schlußfolgerung, daß dies nur auf die Tatsache zurückzuführen sei, daß in dieser Gruppe die Zellen sich in der DNS-Synthesephase auch zum Zeitpunkt der zweiten Carcinogen-Gabe befinden, muß jedoch kritisch betrachtet werden. Obwohl die gleiche Dosen an beide Versuchsgruppen verabreicht wurde, muß man berücksichtigen, daß Tiere der Gruppe "A" vor der Carcinogen-Gabe erneut hepatektomiert wurden und 42% weniger Leberparenchym enthielten. Diese erhöhte Carcinogen/Leber-Proportion dürfte zu diesem Zeitpunkt zu höherer Toxizität und möglicherweise erhöhter carcinogener Wirksamkeit an dem Leberrest führen. Andererseits dürfte in dieser Versuchsgruppe die Metabolisierung von Diäthylnitrosamin infolge der verringerten Zahl der Hepatozyten verzögert sein (Scherer und Emmelot, 1976).

Das bedeutet eine längere Expositionszeit der Zelle gegenüber dem Carcinogen und damit möglicherweise auch eine erhöhte Transformationswirkung.

Die untersuchten morphologischen Eigenschaften der praeneoplastischen Läsionen stimmen weitgehend mit schon in anderen Untersuchungen beschriebenen Beobachtungen überein. Die enzymhistochemische Reaktion, die sich als am besten geeignet für die Charakterisierung der praeneoplastischen Läsionen zeigte, war die ATPase-Reaktion. Die relative Defizienz betrifft bei dieser Reaktion in der Regel sowohl die kanalikuläre wie zytoplasmatische ATPase. Die Inseln sind herdförmig und lassen sich vom übrigen Parenchym gut abgrenzen (Abbildungen 17, 18, 19, 20 u. 21).

ATPase-freie Bezirke traten sowohl "zentral" im Leberläppchen auf als auch in der Nachbarschaft von Portalfeldern. Die "lobulo-zentrale" Lokalisation, gelegentlich in unmittelbarer Nähe der "Zentralvene", ist als typischer Befund in Dauerversuchen mit Diäthylnitrosamin beschrieben worden (Friedrich-Freksa et al., 1969).

In Stopversuchen und nach partieller Hepatektomie sind Defektbezirke vorwiegend in der Nähe von Portalfeldern zu sehen (Scherer und Emmelot, 1976). Eine Erklärung dafür könnte der Zusammenhang zwischen Leberregeneration und Proliferationsmuster im Leberläppchen sein (Scherer und Emmelot, 1976) und die Tatsache, daß nach partieller Hepatektomie die Regeneration der Hepatozyten in der Nähe des Portalfeldes startet (Rabes et al., 1976), was auch nach einmaliger HU-Synchronisation (Rabes et al., 1979) sowie nach zweimaliger HU-Synchronisation (Abbildungen 9 u. 10) der Fall ist.

Die gute Korrelation zwischen ATPase-Defektbezirken mit herdförmigen morphologischen Veränderungen und zellkinetischen Abweichungen vom Normalparenchym in den Serienpräparaten erlauben die Vorstellung, daß der erhöhte Wachstumsprozeß in den frühen Stadien der Tumorentwicklung in der Leber fokal entsteht. Es scheint jedoch unwahrscheinlich zu sein, daß mehrere Hepatozyten gleichzeitig maligne Transformiert werden. Das schließt andererseits nicht aus, daß Zellen in der Umgebung Veränderungen aufweisen können, die dazu beitragen, ein günstiges Mikro-Milieu für die Expression der malignen Transformation und die Wachstumsrate der Zielzellen zu schaffen.

Der Übergang vom Stadium der Praeneoplasie zum autonomen Wachstum, nach der Definition eines malignen Tumors von Willis (1948), ist klinisch nicht erfaßbar. Unbekannt bleibt nach wie vor, ob dieser Übergang von dem noch durch den Wirtsorganismus kontrollierten Wachstum (Rabes et al., 1972) zum autonomen ein abruptes Phänomen (Büngeler, 1951) oder ein fließender Prozeß ist.

Ähnlich wie bei menschlichen Tumoren, die sich als ein Mosaik aus klonalen Populationen unterschiedlicher Wachstumsaktivität darstellen (Rabes et al., 1979), dürften auch in den praeneoplastischen Läsionen Klone von Zellen auftreten, die eine unterschiedliche Wachstumsrate haben und sich biologisch unterschiedlich verhalten. Neuere Untersuchungen sprechen für die Annahme, daß die Entstehung eines Tumors auf eine "klonale Selektion" zurückzuführen ist (Rabes et al., in Vorbereitung).

D. ZUSAMMENFASSUNG

Die Leber adulter Ratten ist ein stabiles Organ, das durch Teilresektion zur Proliferation angeregt werden kann. Klassisches Beispiel ist die Proliferationsinduktion durch eine Zweidrittel-Hepatektomie. Die Regeneration erfolgt nach einer solchen Teilresektion in einem streng regulierten Ablauf. 15 Stunden nach der Operation treten die ersten Hepatozyten in die DNS-Synthesephase ein. Das Maximum ist nach 24 Stunden erreicht.

Diese physiologische Teilsynchronisation des Regenerationsvorgangs kann durch temporäre Gabe von Cytostatica wie zum Beispiel Hydroxyharnstoff erhöht werden.

Ausgehend von diesen Angaben in der Literatur wurde ein Versuchsmodell entwickelt, bei dem die Zellen der Leber in zwei aufeinanderfolgenden Stufen in vivo in ihren Zellzyklusabläufen synchronisiert werden. Auf der Grundlage der Kinetik dieser zweimaligen Proliferationswellen wurde untersucht, ob eine zweimalige Carcinogenexposition in spezifischen Phasen des Zellzyklus in vivo zu einer Änderung der Transformationsrate der Leberzellen führt.

Drei Wochen nach einer Zweidrittel-Hepatektomie wurden die Versuchtiere erneut operiert. Dabei wurde der Lobus dexter lateralis entnommen, der nach Trockengewichtsbestimmungen 42% der gesamten regenerierten Leber entspricht.

Sowohl nach der ersten Zweidrittel-Hepatektomie wie nach dem zweiten Regenerationsreiz durch die 42%ige Hepatektomie bekamen die Tiere Hydroxyharnstoff-Dauerinfusionen in die Schwanzvene.

Die Infusionen begannen jeweils 14 Stunden nach den Operationen, bevor die ersten Zellen in die DNS-Synthesephase eintreten. Unter der Wirkung dieses Hydroxyharnstoff-Dauerblockes werden die Zellen im G_1-S-Grenzbereich akkumuliert und treten nach Aufhebung des Blockes synchron in die DNS-Synthesephase ein.

Der Synchronisationsgrad wurde durch autoradiographische Untersuchungen bestimmt. Die Versuchstiere erhielten eine Stunde vor der Tötung ^{3}H-markiertes Thymidin. Der Anteil markierter Zellen (Markierungsindex) im Autoradiogramm der Leber ist ein Maß für den Anteil der proliferierenden Zellen.

Um die zellkinetischen Parameter in diesem Versuchsmodell zu bestimmen, wurden zwei Versuchsgruppen gebildet.
Tiere der ersten Gruppe wurden jeweils 14 Stunden nach Zweidrittel-Hepatektomie für eine Dauer von 10 Stunden mit Hydroxyharnstoff infundiert. Drei Wochen danach wurden die Tiere ein zweites Mal teilhepatektomiert und wieder 10 Stunden lang mit Hydroxyharnstoff infundiert. Nach dem Hydroxyharnstoff-Block wurden die Tiere in einstündigen Abständen getötet, nachdem sie 60 Minuten vorher eine ^{3}H-Thymidin-Injektion erhalten hatten.

Tiere der zweiten Gruppe wurden nur einmal nach einer Zweidrittel-Hepatektomie 10 Stunden lang mit Hydroxyharnstoff infundiert und danach in gleicher Weise wie die der ersten Gruppe mit ^{3}H-Thymidin behandelt und getötet.

Die Markierungsindices der Hepatozyten wiesen einen fast übereinstimmenden Verlauf in beiden Versuchsgruppen auf.

Die zweimalig operierten Tier-Gruppe zeigte ein Maximum von 68% markierter Hepatozyten in der 4. Stunde nach Absetzen des Hydroxyharnstoff-Blockes. Ein Maximum von 82% fand sich zum gleichen Zeitpunkt bei den lediglich einmal teilhepatektomierten Tieren. Das intralobuläre Verteilungsmuster markierter Zellen im Leberparenchym war in beiden Versuchsgruppen etwa gleich.

Diese beiden Modelle wurden zur Analyse der Wirkung von Carcinogenen in Relation zur Zellproliferation verwendet.
In der Versuchsgruppe wurden zweimalig teilhepatektomierte und mit Hydroxyharnstoff dauerinfundierte Ratten nach jeder Operation jeweils eine Stunde nach Absetzen des Hydroxyharnstoffes, d.h. in der frühen DNS-Synthesephase, mit Diäthylnitrosamin in einer Dosis von 40 mg/kg Körpergewicht injiziert. Als Kontrollen dienten 3 Tiergruppen: a) Tiere, die Diäthylnitrosamin nach nur einmaliger Teilhepatektomie und Hydroxyharnstoff-Block erhielten, die zweite Diäthylnitrosamin-Injektion erfolgte jedoch ohne eine vorausgehende Teilhepatektomie im Abstand von 3 Wochen; b) Ratten mit einmaliger Diäthylnitrosamin-Injektion nach partieller Hepatektomie und Hydroxyharnstoff-Infusion; c) Tiere mit zweimaliger Carcinogen-Injektion im Abstand von 22 Tagen.

90 und 180 Tage nach Carcinogenexposition wurde in allen Versuchsgruppen die Entstehung praeneoplastischer Läsionen mit enzymhistochemischen Methoden zum Nachweis von ATPase, Glukose-6-Phosphatase und γ-Glutamyl-Transpeptidase und mit autoradiographischen Methoden untersucht.
Zahl und Fläche praeneoplastischer ATPase-Defektbezirke wurden mit Hilfe eines semiautomatischen Planimetriegerätes in einer Gesamtschnittfläche von 10 cm^2

pro Einzeltier (180 Tage nach Carcinogenbehandlung) bzw. von 5 cm^2 pro Tier (90 Tage nach Carcinogenbehandlung) quantitativ ausgewertet.

Unter einem Maskenvergleichsmikroskop wurden die drei enzymhistochemischen Reaktionen miteinander und mit den autoradiographischen Präparaten verglichen.

Bereits 90 Tage nach Carcinogenbehandlung zeigte sich eine deutliche Tendenz zu vermehrter Entstehung sowie einer größeren Flächenausdehnung der praeneoplastischen ATPase-Defektbezirke bei den zweimalig teilhepatektomierten, Hydroxyharnstoff-synchronisierten und in der frühen DNS-Synthesephase nach dem Hydroxyharnstoff-Block mit Carcinogen behandelten Tiere gegenüber den Kontrollgruppen.

Die Untersuchungen 180 Tage nach Carcinogenbehandlung bestätigten diese Ergebnisse mit statistischer Signifikanz.

Unter den Kontrollgruppen zeigte sich eine abnehmende Zahl und Größenentwicklung der ATPase-Defektbezirke in der Leber in folgender Reihenfolge: a) zweimalig mit Carcinogen behandelte Tiere, wobei die erste Injektion nach partieller Hepatektomie und Hydroxyharnstoff-Dauerinfusion, die zweite ohne zusätzliche Eingriffe appliziert wurde; b) einmalig mit Carcinogen nach partieller Hepatektomie und Hydroxyharnstoff-Dauerinfusion behandelte Tiere; c) zweimalige Carcinogen-Injektion ohne zusätzliche Behandlung.

Generell wiesen ATPase-Defektbezirke einen höheren ^{3}H-Thymidin-Markierungsindex auf als das umgebende Leberparenchym.

Diese Ergebnisse bestätigen die Bedeutung der Zellproliferation für die Entstehung praeneoplastischer Populationen in der Leber nach limitierter Carcino-

exposition. Darüber hinaus ergeben sich Hinweise dafür, daß eine zweimalige Carcinogeneinwirkung in der DNS-Replikationsphase die Wahrscheinlichkeit der malignen Transformation erhöht.

Spekulativ könnte angenommen werden, daß eine promutagene DNS-Läsion durch die DNS-Replikation zu einer rezessiven Mutation führt, die sich erst durch eine zweite Carcinogen-induzierte DNS-Läsion während der Replikation des homologen DNS-Abschnitts exprimiert.

E. LITERATURVERZEICHNIS

Altmann, H.-W.: Der Zellersatz, insbesondere an den parenchymatösen Organen. Verh. dtsch. Ges. Path. 50, 15-33 (1966).

Amlacher, E.: Autoradiographie in Histologie und Cytologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1974.

Bannasch, P.: The cytoplasm of hepatocytes during carcinogenesis. In: Rec. Res. Cancer Res., Vol. 19, Springer Berlin, Heidelberg, New York, 1968.

Bannasch, P.: Cytology and cytogenesis of neoplastic (hyperplastic) hepatic nodules. Cancer Res. 36, 2555-2562 (1976).

Berenblum, I.: Sequential aspects of chemical carcinogenesis: Skin. In: F.F. Becker (Ed.): Cancer: A Comprehensive Treatise, Vol. I, p. 323-344, Plenum Press, New York, 1975.

Bucher, N.L.R.: Experimental aspects of hepatic regeneration. N.Engl. J. Med. 277, 686-695 (1967).

Bucher, N.L.R.: Experimental aspects of hepatic regeneration (Concluded). N.Engl. J. Med. 277, 738-745 (1967).

Büngeler, W.: Geschwülste und regulierte abhängige Wachstumsstörungen (Hyperplasien) im Rahmen der Cellular- und Relationspathologie. Z. Krebsforschung 58, 72-102 (1951).

Cerda-Olmedo, E., Hanawalt, P.C. and Guerola, N.: Mutagenesis of the replicating point by nitrosoguanidine: map and pattern of replication of the Escherichia coli chromosome. J. Mol. Biol. 33, 705-719 (1968).

Cohen, S.S. and Barner, H.D.: Studies on Unbalanced Growth in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 40, 885-893 (1954).

Cote, J., Oehlert, W. and Büchner, F.: Autoradiographische Untersuchungen zur DNS-Synthese während der experimentellen Kanzerisierung der Leberparenchymzelle durch Diäthylnitrosamin. Beitr. Pathol. Anat. Allgem. Pathol. 127, 450-473 (1962).

Craddock, V.M. and Frei, J.V.: Induction of liver cell adenomata in the rat by a single treatment with N-Methyl-N-Nitrosourea given at various times after partial hepatectomy. Br. J. Cancer 30, 503-511 (1974).

Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S. und Schmähl, D.: Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. Z. Krebsforschung, 69, 103-201 (1967).

Farber, E.: Biochemistry of carcinogenesis. Cancer Res. 28, 1859-1869 (1968).

Farber, E.: Hyperplastic areas, hyperplastic nodules, and hyperbasophilic areas as putative precursor lesions. Cancer Res. 36, 2532-2533 (1976).

Foulds, L.: Multiple etiologic factors in neoplastic development. Cancer Res. 25, 1339-1347 (1965).

Fridman-Manduzio, A., Gol-Winkler, R., Betz, E.H. and Goutier, R.: Tumor frequency and characteristics after a single dose of dimethylnitrosamine or diethylnitrosamine in partially hepatectomized rats. Z. Krebsforschung, 90, 13-24 (1977).

Friedrich-Freksa, H., Gössner, W. und Börner, P.: Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach Dauergaben von Diäthylnitrosamin. Z. Krebsforschung, 72, 226-239 (1969).

Gössner, W. und Friedrich-Freksa, H.: Histochemische Untersuchungen über die Glukose-6-Phosphatase in der Rattenleber während der Kanzerisierung durch Nitrosamine. Z. Naturforsch. 19 b, 862-863 (1964).

Goth, R. und Rajewsky, M.F.: Molecular and cellular mechanisms associated with pulse-carcinogenesis in the rat nervous system by ethylnitrosourea: ethylation of nucleic acids and elimination rates of ethylated bases from the DNA of different tissues. Z. Krebsforschung, 82, 37-64 (1974).

Grundmann, E. und Sieburg, H.: Die Histogenese und Cytogenese des Lebercarcinoms der Ratte durch Diäthylnitrosamin im lichtmikroskopischen Bild. Beitr. path. Anat. 126, 57-90 (1962).

Hanawalt, P.C., Cooper, P.K., Ganesan, A.K. and Smith, C.A.: DNA repair in bacteria and mammalian cells. Annual Rew. Biochem. 48, 783 (1979).

Hanawalt, P.C. and Setlow, R.B.: Molecular mechanisms for the repair of DNA (eds) Plenum Press, New York, 1975.

Higgins, G.M. and Anderson, R.M.: Experimental pathology of the liver; restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Arch. Path. 12, 186-202 (1931).

Hince, T.A. and Neale, S.: Physiological modification of alkylating agent induced mutagenesis. II. Influence of the numbers of chromosome seplicating forks and gene copies of the frequency of mutations induced in Escherichia coli. Mut. Res. 43, 11-24 (1977).

Hoffmann, G.: Kurzer Abriß der Anatomie und Physiologie der Laboratoriumstiere. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1956.

Iseler, G.: Untersuchungen zur Synchronisation der DNA-Synthese in der regenerierenden Rattenleber nach Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung. Dissertation München, 1977.

Kitagawa, T. and Sugano,H.: Combined enzyme histochemical and autoradiographic studies on areas of hyperplasia in the rat liver of rats fed N-2-Fluorenylacetamide. Cancer Res. 33, 2993-3001 (1973).

Leduc, E.H.: Regeneration of the liver. In: Rouiller,C. (ed) The Liver. Academic Press Inc. New York, 1964.

Loveless, A.: Possible relevance of O^6-alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity of nitrosamines and nitrosamides. Nature 223, 206-207 (1969).

Magee, P.N. and Farber,E.: Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat liver nucleic acids by dimethylnitrosamine in vivo. Biochem. J. 83, 114 (1962).

Magee, P.N., Pegg, A.E. and Swann, P.F.: Molecular mechanisms of chemical carcinogenesis. In: Handb. Allg. Path., Band 6, Geschwülste, II/6, p.329-419. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1975.

Miller, E.C. and Miller, J.A.: The mutagenecity of chemical carcinogens: correlations, problems and interpretations. In: A. Hollaender (ed) Chemical mutagens-principles and methods for their detection. Vol.1, p.83-118. Plenum Press, New York, 1971.

Miller, E.C.: Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: Presidential Address. Cancer Res. 38, 1479-1496 (1978).

Miller, J.A.: Carcinogenesis by chemicals: An Overwiew-G.H.A. Clowes Memorial Lecture. Cancer Res. 30, 559-576 (1970).

Nicoll, J.W., Swann, P.F. and Pegg, A.E.: Effect of dimethylnitrosamine on persistence of methylated guanines in rat liver and kidney DNA. Nature 254, 261-262 (1975).

Oehlert, W., Hämmerling, W. and Büchner,F.: Der zeitliche Ablauf und das Ausmaß der Desoxyribonukleinsäure-Synthese in der regenerierenden Leber der Ratte nach Teilhepatektomie. Beitr. path. Anat. 126, 91-112 (1962).

Oehlert, W. und Hartje, J.: Die Veränderungen des Eiweiß-Ribonucleinsäure-Stoffwechsels der Leberepithelzelle während der experimentellen Cancerisierung durch Diäthylnitrosamin. Beitr. path. Anat. 128, 376-415 (1963).

Plageman, P.G.W. and Erbe, J.: Intracellular conversions of desoxyribonucleosides by Novikoff rat hepatoma cells and effects of hydroxyurea. J. Cellular Physiol., 83, 321-336 (1974).

Pitot, H.C., Barness, L., Goldsworthy, T. and Kitagawa, T.: Biochemical characterisation of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine. Nature 271, 456-458 (1978).

Pitot, H.C. and Heidelberger, C.: Metabolic regulatory circuits and carcinogenesis. Cancer Res. 23, 1694-1700 (1963).

Pugh, T.D. and Goldfarb, S.: Quantitative histochemical and autoradiographic studies of hepatocarcinogenesis in rats fed 2-acetylaminofluorene followed by phenobarbital. Cancer Res. 38, 4450-4457 (1978).

Rabes, H.M.: Kinetics of hepatocellular proliferation after partial resection of the liver. In: H. Popper and F. Schaffner (eds), Progress in Liver Diseases, Vol. 5, p. 83-99. Grune and Stratton, New York, San Francisco, London, 1976.

Rabes, H.M.: Proliferative Vorgänge während der Frühstadien der malignen Transformation. Verh. dtsch. Ges. Pathol. 63, 18-39 (1979).

Rabes, H.M., Bücher, Th., Hartmann, A.A., Linke, I. and Dünnwald, M.: Clonal growth of carcinogen-induced enzyme-deficient preneoplastic cell populations in mouse liver. Eingesandt an Cancer Research.

Rabes, H.M., Carl, P., Meister, P. and Rattenhuber, U.: Analysis of proliferative compartments in human tumors. Cancer 44, 799-812 (1979).

Rabes, H.M., Kerler, R., Wilhelm, R., Rode, G. and Riess H.: Alkylation of DNA and RNA by ^{14}C dimethylnitrosamine in hydroxyurea-synchronized regenerating rat liver. Cancer Res. 39, 4228-4236 (1979).

Rabes, H.M., Scholze, P. and Jantsch, B.: Growth kinetics of diethylnitrosamine-induced, enzyme-deficient "preneoplastic" liver cell populations in vivo and in vitro. Cancer Res. 32, 2577-2586 (1972).

Rabes, H.M. und Tuczek, H.V.: Quantitative autoradiographische Untersuchung zur Heterogenität der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie. Virch. Arch. Abt. B. Zellpath. 6, 302-312 (1970).

Rabes, H.M., Wirsching, R., Tuczek, H.V. and Iseler, G.: Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. Cell Tissue Kinetic 9, 517-532 (1976).

Radman, M.: SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. In: P. Hanawalt and R.B. Setlow (eds). Molecular Mechanisms for Repair of DNA. Part A, p.355-367. Plenum Press, New York, 1975.

Rajewsky, M.F., Hülser, D.F. und Fabricius, E.: Untersuchungen zur Synchronisation in vivo: Temporäre Inhibition der DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff in normalen und malignen Säugerzellsystem. Z. Krebsforschung 76, 266-292 (1971).

Rappaport, A.M.: Acinar units and the pathophysiology of the liver. In: Ch. Rouiller (Ed), The Liver, p. 365-328, Academic Press, New York, 1963.

Rappaport, A.M.: The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure. Beitr. Path. 157, 215-243 (1976).

Rutenburg, A.M., Kim, H., Fishbein, J.W. Hanker, J.S. Wasserkrug, H.L. and Seligman, A.M.: Histochemical and ultrastructural demonstration of γ-glutamyl-transpeptidase activity. J. Histochem. Cytochem. 17, 517-526 (1969).

Sasaki, T. and Yoshida, T.: Experimentelle Erzeugung des Lebercarcinoms durch Fütterung mit O-Aminoazotoluol. Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med. 295, 175-200 (1935).

Schauer, A. und Kunze, E.: Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen während der Cancerisierung der Rattenleber mit Diäthylnitrosamin. Krebsforschung 70, 252-266 (1968)

Scherer, E. and Emmelot, P.: Kinetics of induction and growth of enzyme-deficient islands involved in hepatocarcinogenesis. Cancer Res. 36, 2544-2554 (1976).

Scherer, E., Hoffmann, M., Emmelot, P. and Friedrich-Freksa, M.: Quantitative study of foci of altered liver cells induced in the rat by a single dose of diethylnitrosamine and partial hepatectomy. J. Nat. Cancer Inst. 49, 93-106 (1972).

Schmidkonz, P.: Stereologisch-Morphometrische Untersuchungen an der regenerierenden Rattenleber nach Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung. Dissertation München, 1979.

Schmidkonz, P., Hübner, G. und Rabes, H.M.: Morphometrische Untersuchungen zur hepatozellulären Hypertrophie bei Hydroxyharnstoff-induziertem "unbalanced growth". Verh. dtsch. Ges. Pathol. 61, 473 (1977).

Schwartz, H.S., Garofalo,M., Sternberg, S.S. and Philips, F.S.: Hydroxyurea: Inhibition of deoxyribonucleic acids synthesis liver of rats. Cancer Res. 25, 1867-1870 (1965).

Simpson, G.E.C. and Finckh, E.S.: The pattern of regeneration of rat liver after repeated partial hepatectomies. J. Pathol. Bact. 86, 361-370 (1963).

Sinclair, W.K.: Hydroxyurea: Effects an chinese hamster cells growth in culture. Cancer Res. 27, 297-308 (1967).

Solt, D. and Farber, E.: New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. Nature, 263, 701-703 (1976).

Steel, G.G.: Growth kinetics of tumors. Clarendon Press, Oxford, 1977.

Stöcker, E.: Der Proliferationsmodus in Niere und Leber. Verh. dtsch. Ges. Pathol. 50, 53-74 (1966).

Thomas, C.: Zur Morphologie der durch Diäthylnitrosamin erzeugten Leberveränderungen und Tumoren bei der Ratte. Z. Krebsforschung 64, 224 (1961).

Tuczek, H.V. und Rabes, H.M.: Autoradiographische Untersuchungen über intralobuläre Differenzen der Flußrate von Hepatocyten in das S-Kompartiment in Frühstadien nach partieller Hepatektomie. Virch. Arch. Abt. B Zellpath. 15, 55-63 (1973).

Virchow, R.: Reizung und Reizbarkeit. Virchows Archiv. path. Anat. 14, 1-63 (1858).

Wachstein, M. and Meisel, E.: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiological pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi. Am. J. Clin. Pathol. 27, 13-23 (1957).

Walters, R.A. Tobey, R.A. and Ratliff, R.L.: Cell-cycle-dependent variations of deoxyribonucleoside triphosphate pools in chinese hamster cells. Biochim. Biophys. Acta 319, 336-347 (1973).

Willis, R.A.: Pathology of Tumors. Butterworth, London, 1948.

Wirsching, R.: Quantitative autoradiographische Untersuchungen zur Kinetic der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie. Dissertation München, 1974.

Yarbro, J.W., Nichaus, W.G. and Barnum, C.P.: Effect of hydroxyurea on regenerating rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 592-597 (1965).

Young, W.C. and Hodas, S.: Hydroxyurea: inhibitory effect on DNA metabolism. Science 146, 1172-1174 (1964).

LEBENSLAUF

Am 13. Januar 1952 wurde ich als ältester Sohn des Geschäftsmannes Lino Hartmann und seiner Ehefrau Eliza, geborene Endres, in Montenegro, Brasilien, geboren.

Nach 4 Jahren Volksschulzeit besuchte ich von 1963 bis 1967 das Gymnasium "São João Batista" in Montenegro und anschließend von 1968 bis 1970 das "Colégio Champagnat" in Porto Alegre, Brasilien.

Im Jahr 1971 leistete ich meinen Militärpflichtdienst und nahm gleichzeitig an einem Vorbereitungskurs für die Aufnahmeprüfung zum Medizinstudium teil, die ich im gleichen Jahr absolvierte.

Vom Jahre 1972 bis 1977 Studium der Humanmedizin an der "Fundação Faculdade Católica de Medicina" in Porto Alegre, wo ich nach dem Studium bis Mai 1979 als wissenschaftlicher Assistent im Fachbereich Pathologie tätig war.

Am 20. Oktober 1979 heiratete ich meine Frau Rosaura, geborene Rigatti.

Seit Oktober 1979 bin ich am Pathologischen Institut der Universität München als Stipendiat des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD) tätig.